

UNIVERSITE DE NANCY I

THESE DE DOCTORAT D'ETAT EN PHARMACIE

RELATIONS
ENTRE L'ACTIVITE ET LA STRUCTURE QUATERNAIRE
DE L'ATPase MITOCHONDRIALE

Présentée le 14 septembre 1973

par

Yves LANDRY

JURY : Président : M. PIERFITTE
Examineurs : A. STAHL
G. SIEST
A. GOFFEAU

TOME I

UNIVERSITE DE NANCY I

U. E. R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ADMINISTRATION

DIRECTEUR

Professeur R. BENE

SECRETAIRE PRINCIPAL

M. MASSON

ENSEIGNEMENT

DOYENS HONORAIRES

MM. RICHARD G.
BERNANOSE A.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. CORDEBARD H.
FRANQUET R.
STEIMETZ E.

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

M. ANZIANI P.
Mme LASSEUR A.

PROFESSEURS

M. MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Mlle FRANÇOIS M. Th.	Matière médicale
MM. MARCHAL J. G.	Microbiologie
SOLEIL J.	Pharmacie Chimique
BERNANOSE A.	Physique
Mlle BESSON S.	Pharmacodynamie
MM. BENE R.	Sciences biologiques
MIRJOLET M.	Chimie analytique et toxicologie
PIERFITTE M.	Chimie biologique
MARTIN J. A.	Chimie minérale et minéralogie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mlle GIRARD Th.	Hygiène
MM. HAYON J. Cl.	Matière médicale et botanique
SCHWARTZBROD L.	Microbiologie
SIEST G.	Chimie biologique
MM. BONALY R.	Chimie biologique
LEMAY R.	Législation et déontologie pharmaceutique
LOPPINET V.	Chimie organique
VIGNERON C.	Sciences biologiques appliquées à la pharmacie

MAITRES DE CONFERENCES DELEGUES

MM. BAUDOT Ph.	Toxicologie
BOYER P.	Physique
LECTARD P.	Biologie Végétale et Cryptogamie

MAITRES-ASSISTANTS

M. MONAL	Sciences pharmaceutiques
Mme BALDO	Microbiologie
M. HOFFMAN	Pharmacie galénique
M. JACQUE	Pharmacodynamie
Mme HOFFMAN	Pharmacie galénique
Mlle PANEK	Chimie biologique
Mme SCHWARTZBROD	Microbiologie

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'Enzymologie, groupe Euratom, de l'Université de Louvain.

Il a pu être effectué grâce à une bourse de recherche «Euratom», accordée par la Commission des Communautés Européennes.

Qu'elle en soit remerciée ici en la personne de Monsieur F. W. Laske.

Monsieur le Professeur A. Goffeau nous a accueilli dans son laboratoire et a dirigé nos travaux avec efficacité et intérêt.

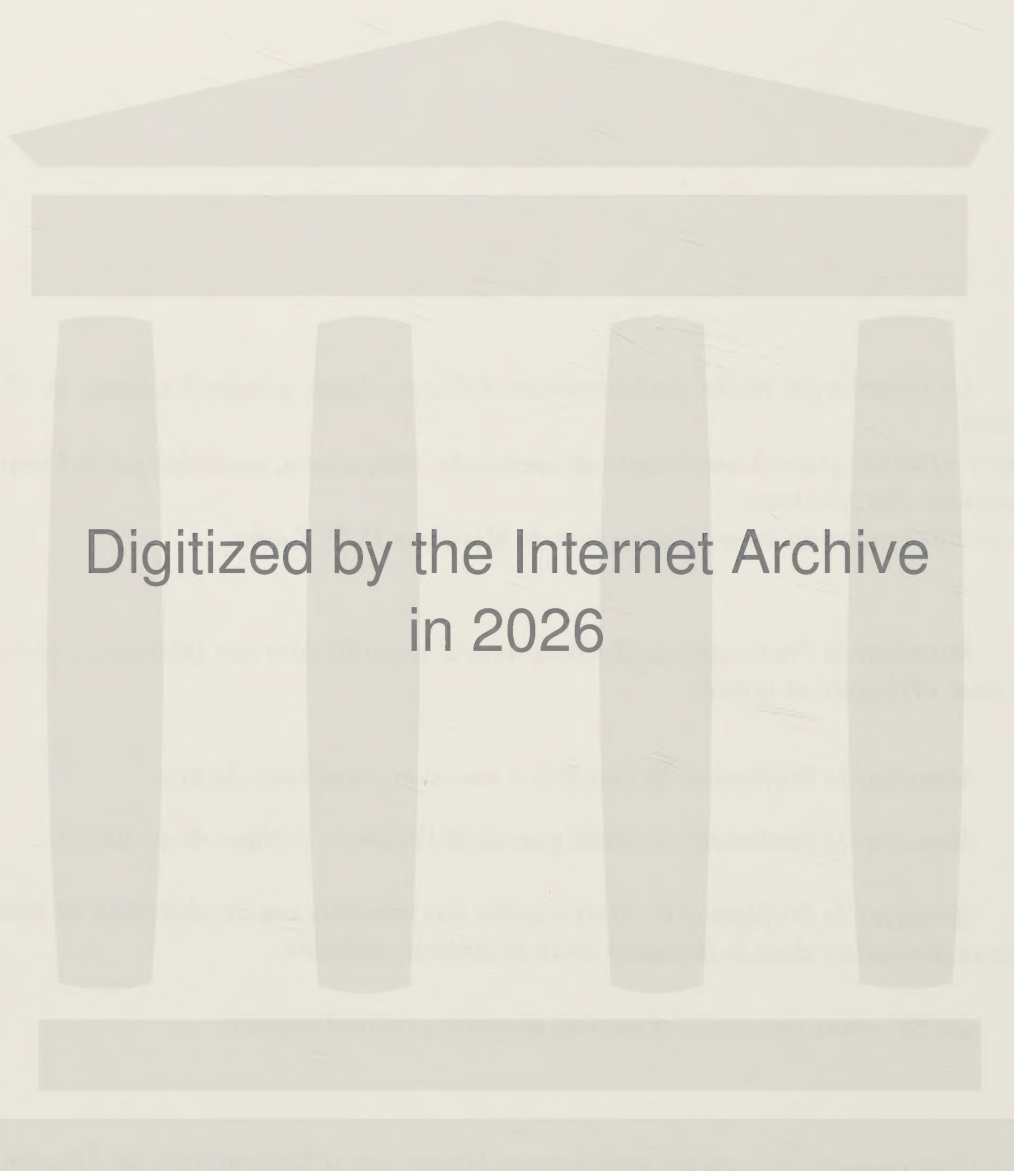
Monsieur le Professeur M. Pierfitte a assuré la présidence du jury.

Monsieur le Professeur A. Stahl a accepté l'examen critique de ce travail.

Monsieur le Professeur G. Siest a guidé nos premiers pas de chercheur et nous a encouragé à nous spécialiser dans le domaine de la biochimie cellulaire.

Qu'ils soient remerciés et assurés de notre profond respect.

Nous remercions tous les membres du laboratoire d'Enzymologie de Louvain, du laboratoire de Biochimie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, et du laboratoire du Centre de Médecine Préventive de Vandoeuvre-Nancy, pour leur aide et leur sympathie pendant la préparation de ce travail et de nos travaux précédents.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555419_0035

RELATIONS
ENTRE L'ACTIVITE ET LA STRUCTURE QUATERNAIRE
DE L'ATPase MITOCHONDRIALE

A mes parents

A ma femme

A toute ma famille

RELATIONS
ENTRE L'ACTIVITE ET LA STRUCTURE QUATERNAIRE
DE L'ATPase MITOCHONDRIALE

Yves LANDRY

ABREVIATIONS UTILISEES

- ATP : Adénosine triphosphate.
- ATPase : ATP phosphohydrolase activée par Mg^{++} (E.C.3. 6. 1. 3).
- Activité ATPasique oligo. S. : Activité ATPasique sensible à l'oligomycine.
- Complexe ATPasique : ATPase mitochondriale sensible à l'oligomycine, extraite par action du Triton X-100 et purifiée.
- DCCD : N, N', dicyclohexylcarbodiimide.
- EDTA : Ethylène diamine tétra acétate de sodium.
- Extrait au Triton : Complexe ATPasique non purifié.
- Facteur F_1 : ATPase mitochondriale insensible à l'oligomycine, extraite par des ultra sons et purifiée.
- OSCP : Protéine conférant la sensibilité à l'oligomycine (oligomycin sensitivity-confering protéin).
- PSM : Particules submitochondriales obtenues par action des ultrasons (SMP : sonicated submitochondrial particles).
- SDS : Dodécyl sulfate de sodium (Lauryl sulfate, sodium dodécyl sulfate).
- TBTC : Chlorure d'étain tributylé (Tri Butyl Tin Chlorid).
- Tris : Tris (hydroxyméthyl) aminométhane.
- Triton X-100 : Iso-octyl-phényl-polyéthoxy-éthanol.

PLAN

TOME I

INTRODUCTION	Page : 8
MATERIEL ET METHODES	Page : 15
RESULTATS ET DISCUSSIONS.	Page : 22

Première partie :

« Isolement et purification du complexe ATPasique chez S. pombe cultivée en milieu glycérol »

I . Obtention des particules submitochondriales	Page : 24
II . Action du Triton X-100 sur les PSM	Page : 25
a) influence du temps de contact PSM-Triton	Page : 26
b) influence de l'ATP et de l'EDTA	Page : 26
c) influence de la température lors du contact PSM-Triton	Page : 26
d) influence du pH	Page : 27
e) influence de la force ionique	Page : 27
f) influence de la concentration en Triton	Page : 28
III. Etude de la conservation de l'extrait au Triton	Page : 29
a) température de conservation	Page : 29
b) milieu de conservation	Page : 29
IV. Purification du complexe ATPasique	Page : 30

Deuxième partie :

«Modifications de l'activité ATPasique mitochondriale»

I . Modification par la répression glucose chez <u>S. pombe</u>	Page : 32
II . Modification génétique chez <u>S. pombe</u> : étude du mutant M 126	Page : 33
III. Effets du DCCD sur l'activité du complexe ATPasique de <u>S. pombe</u> cultivé en milieu glycérol.	Page : 35
IV. Effets du DCCD sur des ATPases mitochondriales de différentes origines :	
- <u>S. pombe</u> cultivée en milieu glucose,	Page : 36
- <u>S. cerevisiae</u> ,	Page : 36
- Foie de rat.	Page : 36
V . Effets comparés de la chaleur et du DCCD	
a) cas de <u>S. pombe</u> cultivé en milieu glycérol	Page : 37
b) effets de la chaleur sur l'activité ATPasique de différents organismes :	
- cas de <u>S. cerevisiae</u> et du foie de rat,	Page : 38
- cas de <u>S. pombe</u> cultivée en milieu glucose et du mutant M 126.	Page : 38
c) action du sulfate d'ammonium sur le complexe ATPasique des levures	Page : 38
d) mise en évidence d'une dissociation du complexe ATPasique par la chaleur et le DCCD à hautes concentrations	Page : 39
VI . Effets du TBTC sur l'ATPase mitochondriale de <u>S. pombe</u>	Page : 40
VII. Action de la trypsine sur l'ATPase mitochondriale	Page : 41

Troisième partie :

«Structure quaternaire de l'ATPase mitochondriale de S. pombe»

I . Facteur F ₁	Page : 44
II . Complexe ATPasique	Page : 46
III . Profils électrophorétiques des particules submitochondriales	Page : 47

CONCLUSIONS :

- Action du Triton X-100 sur les particules submitochondriales de levure	Page : 50
- Effets de la répression glucose sur les mitochondries et l'ATPase mitochondriale de la levure <u>S. pombe</u>	Page : 51
- Définition de la mutation M 126 de <u>S. pombe</u>	Page : 51
- Définition de la structure quaternaire de l'ATPase mitochondriale de <u>S. pombe</u>	Page : 51
- Hypothèse d'action du DCCD et de la chaleur sur l'ATPase mitochondriale : Rôle de l'inhibiteur protéique de l'ATPase mitochondriale dans la structure et l'activité de cette enzyme	Page : 52

BIBLIOGRAPHIE	Page : 55
---------------	-----------

TOME II

FIGURES ET TABLEAUX présentés dans l'ordre de citation

- Vingt et un tableaux numérotés A et B, et 1 à 19
- Trente sept figures numérotées de 1 à 37

INTRODUCTION

L'étude de la structure quaternaire des protéines, c'est-à-dire de l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques (« sous unités » ou « protomères ») par des liens généralement non covalents pour former une entité fonctionnelle (ou « oligomère »), est longtemps restée délicate en raison de la complexité des techniques disponibles (Poids moléculaire établi par centrifugation analytique, filtration sur gel ou centrifugation en gradient de densité ; numération des groupements - NH₂ et - COOH terminaux ; analyse de diffraction des rayons X).

Cependant, les techniques d'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'un détergent anionique, le dodécyl sulfate de sodium (SDS) et de mercapto éthanol, ont récemment permis une approche techniquement aisée de l'étude de la structure quaternaire, applicable à toutes les protéines, y compris les protéines membranaires.

En effet Schapiro-Vinuela-Maizel (75) et Weber-Osborn (94) ont montré qu'en présence de SDS la migration électrophorétique des protéines monomériques est proportionnelle à leur poids moléculaire.

Reynold et Tanford (65) ont expliqué ce phénomène en montrant que dans les conditions utilisées, 1,4 g de SDS se fixe sur 1 g de protéine. Cette fixation entraîne une charge négative proportionnelle à la masse, et permet une relation semi-logarithmique entre le poids moléculaire et la mobilité électrophorétique de chaque protomère.

Notons que des techniques d'électrophorèse en gel de polyacrylamide permettent également de déterminer d'autres propriétés des macromolécules telles que rayon moléculaire et valence (67).

Ces techniques récentes d'étude de la structure quaternaire ont été appliquées à l'étude de l'ATPase mitochondriale de coeur de boeuf (39, 68, 69) du foie de rat (15, 41) et de la levure Saccharomyces cerevisiae (87).

L'ATPase mitochondriale (ou ATP phosphohydrolase activée par Mg⁺⁺, EC 3.6.1.3) est généralement considérée comme une forme de l'enzyme qui catalyse les phosphorylations couplées à la chaîne respiratoire c'est-à-dire l'ATPsynthétase associée au transport d'électrons.

Bien que le mécanisme intime de la phosphorylation oxydative reste inconnu, il est établi que l'ATPase en constitue une partie essentielle, aussi bien dans l'hypothèse du couplage chimique énoncée par Slater (76) que dans celle du couplage physique selon la théorie chimiosmotique de Mitchell (54).

Le facteur de couplage F_1 isolé des mitochondries de coeur de boeuf par Pullman, Penefsky, Datta et Racker (58) présente une activité ATPasique. Mais contrairement à l'ATPase intégrée dans la membrane mitochondriale, le facteur F_1 isolé n'est pas sensible à l'oligomycine, inhibiteur de la phosphorylation oxydative et de l'activité ATPasique mitochondriale (50).

Racker (61) a montré que lorsque le facteur F_1 est recombiné à une fraction mitochondriale membranaire (F_0), la sensibilité à l'oligomycine est restaurée. Kagawa et Racker (35) ont extrait des mitochondries de boeuf une forme insoluble et sensible à l'oligomycine de l'ATPase nommée (CF_0-F_1). Cette préparation a été obtenue en traitant des particules submitochondriales successivement par la trypsine, le sulfate d'ammonium et le cholate. Par un procédé comparable, Tzagoloff et al (81) ont isolé du coeur de boeuf et purifié un « complexe ATPasique » sensible à l'oligomycine. Ces auteurs ont montré que le facteur F_1 est un des composants de ce complexe. Tzagoloff a appliqué le même procédé d'extraction du complexe ATPasique à la levure Saccharomyces cerevisiae (82) ; mais ces préparations restent membranaires ou particulières (87). Pour obtenir le complexe ATPasique sous forme monomoléculaire dispersée, Tzagoloff et Meagher (87) ont traité les PSM de S. cerevisiae par un détergent non ionique, le Triton X-100. Après purification de l'extrait obtenu, par centrifugation en gradient de densité, les propriétés et la structure du complexe ATPasique de S. cerevisiae ont pu être étudiées (87 - 90).

Le complexe ATPasique sensible à l'oligomycine comprend deux éléments : le facteur F_1 qui peut être considéré comme la partie purement catalytique du complexe ATPasique, et un ensemble lipoprotéique que l'on peut considérer comme la partie « régulatrice » du complexe ATPasique mitochondrial.

Le facteur F_1 peut être extrait directement par action prolongée des ultrasons sur les particules submitochondriales.

Ce facteur F_1 , purifié par les techniques classiques d'enzymologie, présente une activité ATPasique insensible à l'oligomycine (58) mais sensible à l'antibiotique Dio 9 (70 - 71). Son activité enzymatique est rapidement inactivée à $+ 4^{\circ}\text{C}$ (58). Cette inactivation varie sensiblement selon la composition saline du milieu (63), elle serait due à une dissociation de l'enzyme. Le poids moléculaire du facteur F_1 , isolé du foie de rat est voisin de 384 000 (45), de 347 000 (39) pour le coeur de boeuf, et de 340 000 (87) pour S. cerevisiae.

La composition en sous unité du facteur F_1 isolé du foie de rat, du coeur de boeuf et de Saccharomyces cerevisiae a été déterminée par gel de polyacrylamide - SDS (tableau B).

Ce facteur F_1 comprend cinq types de sous unités de poids moléculaires s'échelonnant de 60 000 à 7 500 daltons.

Certaines sous unités sont donc présentes en plusieurs exemplaires dans une même molécule de facteur F_1 . Brooks et Senior (69) et Knowles et Penefsky (39) pour le coeur de boeuf, et Catteral, Coty et Pedersen (16) pour le foie de rat, ont isolé chaque type de sous unités du facteur F_1 . Knowles et Penefsky ont calculé que les sous unités de plus haut poids moléculaire (A, B et C voir tableau B) correspondent à 93 % de la masse totale du facteur F_1 de coeur de boeuf. Catteral, Coty et Pedersen (16), chez le foie de rat ont rapporté une valeur de 97 % pour ces sous unités, avec une stoechiométrie A_3, B_3, C . Pour ces auteurs les sous unités D et E de faible poids moléculaire ne représenteraient que 3 % de la masse totale du facteur F_1 de foie de rat.

Cependant, ces deux sous unités restent associées à l'enzyme quelques soient les méthodes de séparation utilisées (16). Il semble donc que les deux sous unités de faible poids moléculaire fassent bien partie du facteur F_1 , d'autant plus qu'elles sont retrouvées dans différents organismes par différents auteurs (27, 39, 41, 45, 68, 87).

L'ensemble lipoprotéique ou partie «régulatrice» du complexe ATPasique n'a pas d'activité ATPasique par lui-même. Il a été isolé sous forme particulière par Kagawa et Racker (facteur F_0) (34) et par Tzagoloff, Mac Lennan et Byington (80). Lorsque cette préparation est ajoutée au facteur F_1 , la sensibilité à l'oligomycine est reconstituée. Mac Lennan et Tzagoloff (53) ont isolé, par action de l'ammoniaque sur cet ensemble lipoprotéique particulière, un polypeptide de poids moléculaire voisin de 18 000 daltons, dénommé «OSCP» (protéine conférant la sensibilité à l'oligomycine). La fixation spontanée, *in vitro*, du facteur F_1 sur une fraction membranaire dépourvue de F_1 et d'OSCP, et la sensibilité à l'oligomycine sont obtenues par l'addition du polypeptide OSCP (53 - 84).

La partie «régulatrice» du complexe ATPasique comprend également plusieurs autres peptides appelés «facteurs intrinsèques». Parmi ceux-ci, un peptide pouvant fixer le dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) a pu être isolé. En effet, le DCCD est un inhibiteur de la phosphorylation oxydative et de l'activité ATPasique mitochondriale (6). Mais contrairement à l'oligomycine (10) le DCCD se fixe irréversiblement au complexe ATPasique mitochondrial (10 - 30).

Cattel et al (13 - 14) et Steckhoven et al (78) ont montré que lorsque des particules sub-mitochondriales de coeur de boeuf sont marquées à l'aide de DCCD radioactif, 73 à 78 % de la radioactivité peuvent être extraits au chloroforme-méthanol (2:1 v/v).

La sous unité du complexe ATPasique fixant le DCCD serait donc de nature lipoprotéique.

Par électrophorèse en gel de polyacrylamide, en présence de SDS, le poids moléculaire de cette sous unité a été estimé à 10 000 (13) ou 13-14 000 (78) daltons. Cattel et al (14) ont montré, par chromatographie en couche mince que la radioactivité de particules submitochondriales marquées au DCCD radioactif, n'est pas liée aux phospholipides mais à l'élément protéique.

Selon Tzagoloff, le complexe ATPasique purifié de *S. cerevisiae* comprendrait outre le facteur F_1 et l'OSCP, trois (87) ou quatre (88) «facteurs intrinsèques» de poids moléculaires 29 000, 22 000, et 7 800, soit au total 9 ou 10 types de sous unités. Ce dernier peptide serait de nature lipoprotéique et non colorable au bleu de Coomassie sur gel de polyacrylamide. Notons que, dans ce cas, il n'a pas été montré de sous unités fixant le DCCD. D'autre part, Stekhoven (78) a montré sur le coeur de boeuf la présence de 14 types de sous unités dans le complexe ATPasique, mais la pureté de la préparation et le poids moléculaire des sous unités n'ont pas été définis. Enfin il faut noter que les lipides sont nécessaires à l'expression de la sensibilité à l'oligomycine du complexe ATPasique mitochondrial (63). Leur rôle précis et leur composition sont peu étudiés (36).

D'autre part, sans que l'on puisse affirmer qu'il soit un constituant du complexe ATPasique isolé par les méthodes décrites ci-dessus notons qu'un «inhibiteur protéique» semble étroitement associé à l'ATPase mitochondriale. Cet inhibiteur protéique a été isolé à partir des mitochondries de coeur de boeuf par Pullman et Monroy (59) et par Horstman et Racker (31). Il est stable à la chaleur, mais particulièrement sensible à l'action de la trypsine (59). L'expression de son activité inhibitrice nécessite la présence de Mg^{++} et d'ATP et un pH acide. Selon van de Stadt et al (77) cet inhibiteur favoriserait la fonction ATP synthétase par rapport à la fonction ATPase proprement dite. Récemment, Knowles et Penefsky (40) ont montré que la sous unité de plus faible poids moléculaire du facteur F_1 de coeur de boeuf présente certaines analogies avec l'inhibiteur protéique de l'ATPase mitochondriale de Pullman et Monroy (59). Knowles et Penefsky (40) ont suggéré que cette sous unité inhibitrice de poids moléculaire 7 500 daltons, pourrait être présente, in vivo, sous forme de dimères ou de polymères actifs.

Le complexe ATPasique intervient également dans la structure de la membrane interne des mitochondries. En effet, Racker (62) a montré que les protubérances observées en microscopie électronique par Fernandez-Moran (20) sur les membranes internes des mitochondries de mammifère, après coloration négative, correspondent à l'ATPase. Ces protubérances ont également été observées dans les mitochondries de levure (93).

La biogénèse de l'ATPase mitochondriale a fait l'objet de nombreux travaux. Tzagoloff (83 - 90) a montré que la synthèse de quatre «facteurs intrinsèques» du complexe ATPasique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est inhibée par le chloramphénicol. Ces facteurs seraient donc synthétisés au niveau des ribosomes mitochondriaux. La synthèse des autres peptides du complexe, y compris les sous unités du facteur F_1 et de l'OSCP, est inhibée par le cycloheximide. Ils sont donc vraisemblablement synthétisés sur les ribosomes cytoplasmiques. Les mécanismes d'assemblage de ces peptides, en un complexe fonctionnel intramembranaire, sont totalement inconnus actuellement. L'utilisation, pour une telle étude, d'inhibiteurs de la synthèse protéique présente de nombreux inconvénients. En effet, ces inhibiteurs ont de nombreux effets secondaires,

en particulier au niveau des processus de régulation. La voie d'approche la mieux adaptée à ce problème semble être l'étude de la structure du complexe ATPasique, dans diverses conditions modifiant les processus d'assemblage de ce complexe membranaire.

Les levures sont en matériel précieux pour ce type d'étude. En effet leurs conditions de croissances peuvent être contrôlées et les techniques génétiques appliquées facilement à ces organismes (17).

La levure Schizosaccharomyces pombe (25, 26, 28, 29) est particulièrement propice à l'étude de la biogénèse des composants respiratoires dépendant de l'ADN nucléaire. En effet des mutants nucléaires stables présentant des déficiences mitochondriales, sont facilement obtenus en raison de l'absence de la mutation cytoplasmique rho⁻, très fréquente chez la levure Saccharomyces cerevisiae (9, 17, 28).

Schizosaccharomyces pombe Linder, forme avec S. octosporus et S. versatilis un genre de la sous famille des Endomycetoïdeae, de la famille des Endomycetaceae, de la sous classe des Ascomycètes.

Le nom de cette levure est dû à Linder (1893). Elle fut isolée à partir de la bière est-africaine de millet (appelée «pombe» en Swahili).

S. pombe est également un agent de fermentation de l'arak de Java et du rhum de Jamaïque.

Les cellules de Schizosaccharomyces pombe sont des cylindres de 3,5 microns de diamètre, et d'une longueur variant de 5 à 20 microns. Elles se divisent par scission. S. pombe est une levure haploïde ; la phase diploïde est limitée au zygote formé par la copulation de deux cellules haploïdes végétatives.

Le zygote se transforme en quatre ascospores haploïdes qui germent pour donner des cellules végétatives (55).

Cette levure est dite «petite négative» (17) car des traitements à l'acriflavine ou au bromure d'éthidium n'ont pas permis l'obtention des mutants «petites végétatives» ou rho⁻ à hérédité cytoplasmique c'est-à-dire non mendélienne (17, 28, 29).

Par opposition Saccharomyces cerevisiae est une levure diploïde «petite positive» se multipliant par bourgeonnement.

L'étude de la biogénèse du complexe ATPasique demande une caractérisation préalable de ce complexe dans les souches étudiées.

Or aucun travail n'a encore été réalisé à ce sujet chez S. pombe.

De plus les méthodes utilisées chez d'autres espèces se sont révélées inefficaces chez S. pombe.

- La première partie de cette étude a donc été consacrée à la mise au point des conditions précises d'extraction par le Triton X-100 du complexe ATPasique, à partir des particules submitochondriales de S. pombe cultivée en milieu glycérol.

La purification du complexe ATPasique sensible à l'oligomycine ainsi extrait, a pu être réalisée ensuite.

- La seconde partie de ce travail a été consacrée à l'étude de modifications sélectives de certaines caractéristiques de l'activité du complexe ATPasique. Nous avons étudié les conséquences d'une modification du milieu de croissance : la répression glucose ; d'une mutation héréditaire pléiotropique d'origine nucléaire : la mutation M 126 ; d'un agent chimique : le dicyclohexylcarbodiimide ; d'un agent physique : la chaleur ; et d'un agent enzymatique : la trypsine.

- Dans la troisième partie de ce travail, nous avons utilisé l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium, pour définir la structure quaternaire du facteur F_1 et du complexe ATPasique de S. pombe, et pour préciser en termes de structure quaternaire les modifications de l'activité ATPasique étudiées dans la seconde partie.

MATERIEL ET METHODES

I - Produits chimiques :

L'ATP, la pyruvate kinase, le phosphénol pyruvate sont des produits Boehringer. Le bleu de Coomassie (Brillant Blue R), la deshydrogénase lactique (type II) le cytochrome c (type II) et l'albumine de sérum bovin sont des produits Sigma. La trypsine et l'inhibiteur de la trypsine extrait du soja sont des produits Worthington. Le Triton X-100 est un produit Packard. L'acrylamide est un produit BDH. Le N, N' méthylène bis acrylamide est un produit Fluka. Le N, N, N', N' - tétra méthyl éthylène diamine est un produit UCB. Tous les autres produits sont de qualité analytique.

II - Organismes :

- La souche Schizosaccharomyces pombe 972 h⁻ est la souche sauvage.

Le mutant M 126, a été obtenu par action des rayons X et sélectionné pour son absence de croissance en milieu glycérol (26).

- Saccharomyces cerevisiae D 261 est la souche sauvage.

Les souches sont conservées sur pente inclinée contenant 70 % (p/v) de moût de brasserie et de 2,5 % (p/v) de bacto-agar (Difco).

- Les rats sont de race Sprague Dawley.

III - Conditions de culture :

- Le milieu «glycérol» contient : 2 % de yeast extract (Amberex 1003) ; 0,1 % de glucose et 3,6 % de glycérol.

- Le milieu «glucose» contient : 2 % de yeast extract (Amberex 1003) et 5,8 % de glucose. Les milieux sont ajustés à pH 4,5 avec HCl et stérilisés à l'autoclave.

Le milieu éthanol contient : 3 % d'éthanol, 0,1 % de glucose, 2 % de yeast extract (Difco), 0,2 % de sulfate d'ammonium, 0,2 % KH_2PO_4 . Le milieu est porté à pH 5,8 avec HCl et stérilisé.

- La préculture est effectuée dans un flacon de verre d'un litre, contenant 200 ml de milieu, inoculé à l'aide d'un tube de culture sur moût-agar, le flacon est incubé à 30°C pendant 24 heures sur une table agitante (180 t/mn).

- La culture estensemencée avec 10^6 cellules par ml à partir de la préculture. La croissance est effectuée à 30°C en «fermenteur» de 15 litres NEW BRUNSWICK F₄, contenant 10 litres de milieu agité et aéré par un courant d'air stérilisé par filtration. 4 ml de polypropylène glycol 2 000 (Baker) sont ajoutés comme agent antimousse. Le temps de culture est de 20 heures sur milieu «glucose», 40 heures sur milieu «glycérol» et 18 heures sur milieu «éthanol».

- Les comptages sont effectués à l'aide d'une cellule de Thoma.

- Les cellules sont récoltées à 4°C par centrifugation dans une Sorvall RC-2B à 3 000 g pendant 5 mn, trois lavages à l'eau distillée froide sont effectués. Les cellules sont conservées en culot à 4°C.

- Les poids secs sont mesurés après dessiccation pendant 4 heures, à l'étuve à 110°C et refroidissement en présence de gel de silice.

IV - Mesure de l'activité ATPasique.

L'ADP inhibe l'activité ATPasique. Un système de régénération de l'ATP est donc utilisé (phosphoenol pyruvate-pyruvate kinase).

L'essai est effectué à 30°C pendant 8 mn dans un volume total de 1 ml contenant les réactifs suivants :

- 0,3 M mannitol ; 3 mM ATP ; 20 mM Tris ; 6 mM, $MgCl_2$; 5 mM phosphénol pyruvate ; 40 μg de pyruvate kinase ; 10 μl d'éthanol.

Les concentrations d'inhibiteurs seront indiquées pour chaque cas.

Le pH est ajusté à 8,6 avec HCl.

La réaction débute par l'addition de la fraction cellulaire et arrêtée par addition de 250 μl d'acide perchlorique 2,5 N.

Le phosphate inorganique formé est mesuré selon le protocole de Pullman et Penefsky (60) en utilisant le photomètre Klett-Summerson.

V - Mesure de l'activité cytochrome oxydasique.

Cette mesure est faite selon Schnaitman (communication personnelle).

L'essai est effectué à 30°C à l'aide d'une électrode de Clark reliée à un enregistreur Vitatron. La chambre de 3 ml contient :

- 87 mM tampon phosphate pH 7,4 ; 2,8 mg de tétraméthyl-para-phénylène diamine (TMPD) ; 3 mg d'ascorbate de sodium.

La réaction débute en ajoutant 0,72 mg de cytochrome c.

La pente à l'origine est mesurée, elle correspond à la consommation d'oxygène.

VI - Les protéines.

Les protéines sont mesurées par la méthode de Lowry (52) en utilisant l'albumine de sérum bovin comme étalon.

VII - Mesure de la respiration

La consommation d'oxygène des cellules est mesurée à 30°C à l'aide de l'électrode de Clark dans une chambre de 3 ml contenant :

- 0,1 M de phthalate de potassium-NaOH pH 4,5, 320 mM glucose.

La mesure est faite avec environ 10^8 cellules.

L'appareil de Warburg a été utilisé pour mesurer la consommation d'oxygène et le rejet de CO₂ selon la méthode indirecte de Warburg (92) dans un milieu décrit ci-dessus.

La consommation en oxygène est exprimée en $QO_2 = \mu l \ O_2 \times h^{-1} \times mg \text{ poids } sec^{-1}$
Le dégagement de CO₂ est exprimé en $QCO_2 = \mu l \ CO_2 \times h^{-1} \times mg \text{ poids } sec^{-1}$.

VIII - Electrophorèse en gel polyacrylamide : estimation du poids moléculaire des sous unités protéiques dissociées par le SDS.

Cette technique est pratiquée selon le principe de Vinuela et Maizel (75) décrit par Weber et Osborn (94) et légèrement modifié comme suit :

- Les échantillons protéiques de concentrations finales 2 mg/ml sont dissociés à 100°C pendant 5 mn, en présence de 1 % (p/v) de SDS, 1 % (v/v) de mercaptoéthanol à pH 7,5.
- Le dépôt de 5 à 50 μl additionné de 5 μl de bleu de bromophénol à 0,3 %, 5 μl de mercaptoéthanol et d'une goutte de glycérol, est effectué sur des cylindres de gel de 60 x 4 mm, contenant 10 % d'acrylamide et 0,26 % de bis-acrylamide.
- La migration est effectuée dans un appareil Shandon, pendant 4 heures sous une intensité de 11 mA par tube.
- Les gels sont démoulés ; leur longueur et la migration du bleu de bromophénol sont mesurées.
- La coloration par 0,25 % de bleu de Coomassie est effectuée pendant deux heures à la température ambiante.
- La décoloration est réalisée pendant 12 heures à température ambiante avec de fréquents changements de décolorant, puis pendant 5 à 7 heures à 50°C.
- La migration de chaque bande est mesurée.
- Les gels sont conservés dans une solution d'acide acétique à 7,5 %.

- La mobilité de chaque sous unité est calculée selon la formule suivante :

$$M = \frac{\text{migration de la protéine}}{\text{longueur du gel après coloration}} \times \frac{\text{longueur du gel avant coloration}}{\text{migration du bleu de bromophénol}}$$

- La courbe étalon est tracée sur papier semilogarithmique à partir d'un gel témoin contenant les protéines monomériques suivantes de poids moléculaires connus :

— Albumine de sérum bovin	= 68 000 daltons
— Deshydrogénase lactique	= 36 000 daltons
— Trypsine	= 24 000 daltons
— Cytochrome c	= 11 800 daltons

- Les enregistrements sont accomplis par mesure d'absorbance lumineuse sur l'appareil Kipp-Zonen filtre D (580-650 nm).

IX - Spectre d'absorption des cytochromes.

Les spectres d'absorption sont déterminés sur spectromètre Beckmann Acta V équipé pour les mesures à température de l'azote liquide (Dispositif Shimazu modèle MPS-50 L) et muni d'une lampe au tungstène de 100 watts. La suspension cellulaire d'une densité environ $40 \cdot 10^8$ cellules/ml (ou suspension de PSM à 20 mg protéines/ml), préalablement réduite par un excès de dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) est transférée dans une cuve de 2 mm d'épaisseur et congelée dans l'azote liquide.

Un papier blanc est placé sur la voie de référence du spectrophotomètre.

X - Isolement et purification du complexe ATPasique sensible à l'oligomycine.

Le principe de cette technique s'inspire des travaux de Tzagoloff (85).

A - Principe :

Une fraction subcellulaire de levure enrichie en mitochondries est isolée par centrifugation différentielle après broyage.

Les particules submitochondriales obtenues par sonication des mitochondries, sont soumises à l'action du Triton X-100 qui permet la solubilisation du complexe ATPasique. Ce complexe enzymatique est purifié par centrifugation en gradient de densité.

B - Réactifs :

- Milieu de broyage : 0,4 M saccharose ; 1 mM EDTA ;
50 mM Tris-HCl pH 8,2.
- Milieu intermédiaire : 0,25 M saccharose ; 10 mM Tris-CH₃
COOH pH 7,5.
- Milieu d'extraction : 2 mM ATP ; 1 mM EDTA ; 35 mM Tris-
CH₃ COOH pH 8,3.
- Gradient Saccharose : 5 à 20 % saccharose ; 2 mM ATP ; 1 mM
EDTA ; 35 mM Tris-CH₃ COOH pH 8,3.

C - Mode opératoire :

a) Homogénéisation :

Suspendre 200 g de cellules dans 300 ml de milieu de broyage.
Broyer par fraction de 50 ml, et 25 g de billes.
Éliminer les billes par décantation.
Amener à pH 7,5.
Centrifuger deux fois 10 mn à 3 000 g (centrifugeuse Sorval RC-2B).
Éliminer les culots.

b) Préparation des particules submitochondriales:

Centrifuger le surnageant précédant 30 mn à 16 000 g.
Suspendre le culot mitochondrial dans 50 ml de milieu intermédiaire ;
Ajuster le pH à 7,8 ; centrifuger 15 mn à 30 000 g ;
Remettre le culot en suspension de même manière et centrifuger 15 mn à 100 000 g
(centrifugeuse Christ Oméga 2, rotor 40, 38 000 RPM).
(Dans le cas des cellules cultivées sur milieu glucose les deux centrifugations précé-
dentes sont remplacées par deux centrifugations de 1 heure à 100 000 g).
Suspendre le culot mitochondrial dans 20 ml de milieu intermédiaire et soumettre
aux ultra sons dans l'appareil Bromwill Biosonik 20 Kc, 240 watts, à l'intensité ma-
ximum pendant 1 mn ; centrifuger 30 mn à 100 000 g ; remettre en suspension dans
le milieu d'extraction, centrifuger 60 mn à 100 000 g.
Remettre le culot en suspension dans le milieu d'extraction pour obtenir une concen-
tration en protéines voisine de 20 mg par ml. Congeler par fraction.
Après chaque centrifugation éliminer la couche supérieure blanchâtre et le culot noi-
râtre au fond du tube.
La remise en suspension est facilitée par un homogénéiseur type Potter.

c) Extraction du complexe ATPasique :

A 500 μ l de suspension de particules submitochondriales, ajouter 1 950 μ l de milieu d'extraction et 50 μ l de Triton X-100 à 10 % (p/v).

Centrifuger immédiatement 20 mn à 100 000 g.

Le surnageant est «l'extrait au Triton».

d) Purification du complexe ATPasique :

Déposer 1 ml d'extrait au Triton sur un gradient linéaire de 12 ml de saccharose de 5 à 25 %.

Centrifuger 3 heures à 40 000 RPM rotor 40, centrifugeuse Christ Oméga 2 (150 000 g).

Recueillir 10 à 12 fractions égales.

e) Traitement du complexe ATPasique par le sulfate d'ammonium :

A 1 ml d'extrait au Triton fraîchement préparé ajouter 1 122 mg de sulfate d'ammonium.

Après dissolution, centrifuger 15 mn à 100 000 g.

Récupérer la pellicule surnageante à l'aide d'une baguette de verre, et la remettre en suspension dans 500 μ l de «milieu d'extraction».

XI - ✱ L'isolement des particules submitochondriales de foie de rat est décrit dans la légende de la figure 19.

✱ Les conditions particulières sont indiquées dans les légendes des figures.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Première partie :

**ISOLEMENT ET PURIFICATION DU COMPLEXE ATPasique CHEZ S. POMBE
CULTIVEE EN MILIEU GLYCEROL.**

- I . Obtention des particules submitochondriales (PSM).
- II . Action du Triton X-100 sur les PSM.
- III . Etude de la conservation de l'extrait au Triton.
- IV . Purification du complexe ATPasique.

I - OBTENTION DES PARTICULES SUBMITOCHONDRIALES

Les particules submitochondriales de levure sont généralement préparées par action des ultra sons sur les mitochondries (63) ; D'autres méthodes physiques (fragmentation mécanique) ou physico-chimiques (digitonine, détergents) ont été préconisés pour des mitochondries de mammifères (63). Mais l'utilisation des ultra sons est aisée et présente l'avantage de ne pas introduire d'agent chimique dans le milieu. Il n'existe pas encore, dans le cas de S. pombe, de technique satisfaisante d'isolement des mitochondries. Les techniques par formation de protoplastes (22) ne sont applicables qu'à de petites quantités de levure.

Nous avons donc préparé des particules submitochondriales de S. pombe après broyage aux billes de verre, à partir d'une fraction subcellulaire enrichie en mitochondries obtenue par centrifugation différentielle. Cette fraction mitochondriale est soumise aux ultra sons pendant une minute. Dans ces conditions, les mitochondries de coeur de boeuf sont brisées et la membrane interne est vésiculée, pour former des particules dont la surface externe correspond à la surface interne de la membrane mitochondriale (63). Les particules ainsi obtenues sont récoltées par centrifugation et lavées. Ces lavages, très importants pour l'obtention de particules riches en ATPase permettent d'éliminer à chaque centrifugation le fond noirâtre du culot obtenu et la couche supérieure peu adhérente.

Par la méthode décrite, nous avons obtenu des particules submitochondriales présentant une activité spécifique ATPasique de 6 à 10 (tableau 1) soit un facteur d'enrichissement de 8,5 à 14 par rapport à l'homogénat de départ.

Le rendement en particules submitochondriales est assez faible, mais la pureté obtenue est favorable à l'extraction de l'ATPase. Les résultats obtenus diffèrent sensiblement d'une préparation à l'autre. La purification des PSM par lavages est difficilement reproductible car elle est soumise à l'appréciation de l'opérateur.

D'autre part, nous verrons que l'activité de l'ATPase mitochondriale diminue rapidement aussi bien à + 4° qu'à 22° C. Ces préparations doivent donc être effectuées aussi rapidement que possible.

L'étude de recouvrement d'activité enzymatique (tableau 2), lors de la séparation du culot mitochondrial montre que les méthodes de séparation et de dosage utilisées sont satisfaisantes, car l'ensemble de l'activité enzymatique de l'homogénat est retrouvé en additionnant les activités mesurées dans le culot mitochondrial et le surnageant correspondant.

II - ACTION DU TRITON X-100 SUR LES PARTICULES SUBMITOCHONDRIALES.

Dans ces études nous avons distingué les recouvrements et les rendements d'extraction :

- Les recouvrements sont obtenus en additionnant les activités enzymatiques totales (ou protéines totales) des culots et des surnageants, et en comparant ces sommes avec les activités totales (ou protéines totales) des PSM à partir desquelles l'extraction a été effectuée.
Un recouvrement inférieur à 100 % exprime donc uniquement l'inactivation de l'activité enzymatique.
- Le rendement d'extraction est le rapport exprimé en % de l'activité enzymatique totale retrouvée dans le surnageant, comparée à celle des PSM d'origine.
Le rendement est fonction à la fois de l'inactivation et de l'efficacité de l'extraction.

Pour extraire le complexe ATPasique des PSM de S. pombe cultivé sur milieu glycérol, nous avons appliqué dans un premier temps la méthode préconisée par Tzagoloff pour S. cerevisiae (87). Les PSM furent incubées en présence de 0,2 % de Triton X-100 et de 4 mM Tris - CH₃ COOH pH 6,8 à 4°C, et l'ATPase solubilisée par ce traitement, mesurée dans le surnageant après centrifugation à 100 000 g.

Il ressort du tableau 3 que dans ces conditions, le Triton solubilise une partie de l'ATPase mitochondriale de S. pombe.

Cependant cette extraction est peu spécifique de l'ATPase puisque l'activité spécifique relative de l'extrait est inférieure à celle des PSM. De plus, il apparaît qu'en cours d'extraction, une partie importante de la sensibilité de l'ATPase à l'oligomycine est perdue. Cette perte peut s'expliquer, soit par la non-extraction des facteurs nécessaires à l'expression de la sensibilité à l'oligomycine, soit par l'inactivation du complexe ATPasique pendant l'extraction.

Une étude de recouvrement (tableau 3) a permis de vérifier ces hypothèses : nous avons comparé les activités ATPasiques de la suspension mitochondriale à la somme des teneurs du culot et du surnageant après action du Triton et centrifugation. Cette étude permet d'établir clairement que l'activité ATPasique elle-même, est un peu inactivée (25 %) par le traitement au Triton ; par contre celui-ci inactive fortement (80 %) la sensibilité à l'oligomycine vraisemblablement par dissociation du complexe ATPasique.

Afin d'expliquer les différences entre nos résultats et ceux obtenus par Tzagoloff (87), nous avons effectué les mêmes essais avec S. cerevisiae.

Le tableau 4 montre que la méthode d'extraction est valable dans le cas de S. cerevisiae mais non dans celui de S. pombe car le rendement d'extraction du complexe ATPasique sensible à l'oligomycine est cinq fois plus élevé pour S. cerevisiae, bien que les taux de protéines solubilisées soient identiques chez les deux espèces.

Le complexe ATPasique de S. pombe est donc plus facilement inactivé.

Cette différence semble dès lors montrer que l'action du Triton X-100 sur les PSM varie selon les souches de levures, probablement en raison des variations de la composition physico-chimique des membranes internes des mitochondries et notamment du complexe ATPasique lui-même.

Nous avons donc étudié les conditions d'action du Triton X-100 chez S. pombe cultivée sur glycérol.

a) Influence du temps de contact PSM-Triton.

Nous avons vérifié que l'action du Triton sur les membranes est rapide. Nous avons obtenu des rendements d'extraction comparables pour des temps de contact de 0 à 60 mn (tableau 5).

Le temps de contact est défini comme le temps entre le moment du mélange PSM-Triton et le début de la centrifugation à 100 000 g.

Dans les expériences suivantes, la centrifugation est donc effectuée sitôt après addition du Triton.

b) Influence de l'ATP et de l'EDTA.

La conformation des enzymes est souvent modifiée en présence de leurs substrats (96).

Nous avons donc tenté d'extraire l'ATPase par le Triton X-100 en présence d'ATP. Le tableau 6 montre que la présence d'ATP dans le milieu entraîne une plus grande spécificité dans l'extraction.

En effet, le taux de protéines solubilisées est identique en présence ou en absence d'ATP, mais la solubilisation de l'ATPase est favorisée en présence d'ATP. En fait, l'étude de recouvrement montre que la présence d'ATP protège l'enzyme contre l'action inactivante du Triton.

L'addition d'EDTA augmente l'extraction mais ne protège pas l'enzyme.

L'EDTA pourrait agir en complexant certains cations présents dans la solution d'extraction ; ces cations entraînant une conformation légèrement différente des enzymes membranaires ou intervenant dans les liaisons physico-chimiques entre lipides et protéines (66) assurant la cohésion de la membrane. D'autre part, selon Capaldi (12) les forces répulsives électrostatiques entre complexes protéiques sont augmentées par la suppression des ions divalents.

c) Influence de la température lors du contact Triton-PSM.

Nous avons effectué le traitement des PSM par le Triton à des températures échelonnées de 0 à 50°C.

Une étude des rendements d'extraction montre que le taux des protéines extraites varie peu avec la température (résultats non montrés).

Cependant, au-dessus de 22°C l'activité spécifique de l'ATPase totale, et surtout celle de l'ATPase sensible à l'oligomycine diminue fortement (figure 1a). L'effet de la chaleur sera étudiée plus spécialement dans la seconde partie de ce travail. Notons dès maintenant que la chaleur pourrait entraîner une dissociation du complexe ATPasique avec diminution de l'activité sensible à l'oligomycine ; le complexe dissocié devient sensible au froid (lors de la centrifugation), d'où une diminution de l'activité totale. D'autre part l'étude de recouvrement (figure 1b) montre dès maintenant que l'activité ATPasique peut être stimulée par incubation à 30 ou 40°C.

d) Influence du pH.

La stabilité des membranes dépend largement des liens associatifs qui s'établissent entre les différents complexes lipoprotéiques au sein de la membrane. Par alcalinisation il est possible d'accroître les forces électrostatiques répulsives intramembranaires (96).

Nous avons donc étudié l'influence du pH entre 6 et 9 sur l'extraction du complexe ATPasique et les «protéines totales», à partir de PSM. Les résultats exposés sur la figure 2 confirment l'hypothèse ci-dessus. En effet, à pH 6 on ne solubilise que 10 % des protéines totales des PSM, alors qu'à pH 9 les protéines membranaires sont solubilisées à 75 %.

De plus, l'activité spécifique de l'ATPase solubilisée est plus élevée, lorsque l'extraction est effectuée à pH alcalin : les meilleures conditions d'extraction sont réalisées entre pH 8 et pH 9.

L'ATPase étant moins stable à pH très alcalin, nous avons choisi d'effectuer les essais suivants à pH 8,3.

Ces résultats semblent montrer que les forces électrostatiques liant les complexes protéiques membranaires ne sont pas identiques pour toutes les enzymes membranaires, une extraction sélective basée sur des variations de pH pourrait donc être envisagée pour chaque enzyme membranaire.

e) Influence de la force ionique.

Lanyi (49) a utilisé des concentrations salines élevées pour solubiliser la membrane plasmique bactérienne. D'autre part Lenaz (51) constate une variation biphasique, selon la concentration saline, de la fixation in vitro de phospholipides sur des membranes mitochondriales préalablement délipidées.

Selon Lenaz, les sels auraient deux effets sur les macromolécules :

1. Un effet électrostatique qui dépend de la charge mais est indépendant de la nature du sel ; il est effectif aux faibles concentrations salines.
2. Un effet lyotropique (ou chaotropique) qui dépend de la nature des ions, n'est apparent qu'aux fortes concentrations et agit en induisant un désordre dans la structure de l'eau.

La figure 3 montre l'effet d'une concentration croissante de NaCl sur l'extraction des protéines totales et de l'ATPase à pH constant. A des concentrations en NaCl inférieures à 0,2 M, le taux d'extraction des protéines et de l'ATPase présente une allure biphasique : le minimum d'extraction est obtenu en présence de NaCl 0,1 M ; des concentrations supérieures en NaCl entraînent une extraction accrue.

Aux concentrations supérieures à 0,2 M de NaCl, les rendements apparents de solubilisation de l'enzyme diminuent fortement, mais l'étude de recouvrement montre que ceci est dû en fait à une inactivation de l'activité enzymatique par le NaCl.

En absence de Triton, le NaCl seul n'a pas d'effet quelle que soit la concentration.

- à faible concentration (0 à 0,1 M) le NaCl entraînerait une plus grande cohésion membranaire et donc une extraction diminuée probablement par action sur les forces électrostatiques intramembranaires.

- à plus forte concentration, le NaCl concourerait à l'affaiblissement des forces hydrophobes par effet lyotropique.

Ces résultats correspondent bien aux observations de Lenaz dans le cas de fixation de phospholipides sur des membranes mitochondriales délipidées (51).

D'autre part, nous avons testé l'effet de la concentration en Tris dans le milieu d'extraction. La méthode originale (87) utilise une concentration de 4 mM, insuffisante au bon maintien du pH pendant l'extraction. La figure 4 montre qu'à pH constant (8,3 maintenu par CH_3COOH) l'extraction des protéines totales est constante pour des concentrations de 5 à 240 mM en Tris, mais l'extraction de l'enzyme est maximale à 35 mM.

L'étude de recouvrement montre que l'activité enzymatique n'est pas modifiée par les concentrations en Tris étudiées. Il ne s'agit donc pas d'une inactivation de l'activité ATPasique par des concentrations de Tris supérieures à 35 mM, mais d'une sélectivité accrue de l'extraction de l'ATPase à cette concentration de Tris.

Le Tris semble exercer un effet difficile à interpréter en termes physico-chimiques.

Pour les essais suivants nous avons choisi une concentration de 35 mM en Tris.

f) Influence de la concentration en Triton.

L'action précise du Triton X-100 sur la membrane est peu connue. Ce détergent non ionique semble agir grâce à sa nature polaire. Il semble dissocier certains complexes lipoprotéiques des membranes mitochondriales, sans détériorer les interactions protéine-protéine et protéine-lipide au sein de ces complexes.

Dans le cas du dodécylsulfate de sodium, détergent non ionique utilisé pour l'étude de la structure quaternaire des protéines, Reynolds et Tanford (64 - 65) ont montré que 1,4 mg se fixe sur 1 mg de protéines. De même dans le cas de la digitonine, utilisée pour séparer les deux membranes mitochondriales, le rapport détergent-protéine est prépondérant (72).

Pour préciser l'action du Triton X-100, nous avons étudié l'influence de sa concentration sur l'extraction de l'ATPase des PSM.

La figure 5 montre la solubilisation des protéines totales et de l'ATPase par des concentrations croissantes de Triton pour une même concentration de protéine. L'extraction de l'ATPase est maximum à 0,16 % de Triton.

En fait, l'extraction des protéines totales ou de l'ATPase ne dépend pas de la concentration en Triton, mais du rapport protéine-détergent : le tableau 7 montre l'effet d'une même concentration en Triton sur des concentrations croissantes de protéines membranaires. Les résultats sont comparables à ceux de l'expérience précédente, il faut donc conclure que l'extraction du complexe ATPasique sensible à l'oligomycine est maximum pour 1 mg de Triton par mg de protéine membranaire.

Cependant l'étude de recouvrement (figure 5) met en évidence une inactivation proportionnelle à la concentration en détergent.

Cette inactivation pourrait être due à une dissociation du complexe enzymatique par des concentrations élevées de Triton X-100.

III - ETUDE DE LA CONSERVATION DE L'EXTRAIT AU TRITON X-100.

Le complexe ATPasique sensible à l'oligomycine solubilisé à partir de la membrane interne des mitochondries de S. pombe cultivée en milieu glycérol, par le Triton X-100 dans les conditions étudiées ci-dessus, doit être purifié, pour permettre l'étude de sa structure quaternaire.

Il est donc important d'étudier auparavant les conditions de conservation de cet extrait au Triton des PSM.

a) Température de conservation.

La figure 6 montre la conservation de l'activité ATPasique de cet extrait selon le temps et la température. Lorsque l'extrait est congelé à -20°C ou dans l'azote liquide, l'activité ATPasique totale et celle sensible à l'oligomycine sont préservées.

A $+4^{\circ}\text{C}$ l'activité ATPasique totale et l'activité sensible à l'oligomycine diminuent de 70 % en 24 heures et de 95 % en 78 heures.

Notons que dans le cas du facteur F_1 purifié, l'inactivation à $+4^{\circ}\text{C}$ est beaucoup plus rapide (58). D'autre part, à 22°C , l'activité ATPasique totale est sensiblement accrue alors que l'activité sensible à l'oligomycine décroît rapidement ; la perte d'activité est de 35 % en 24 heures et atteint 80 % en 78 heures.

Nous avons déjà noté une augmentation d'activité ATPasique totale par la chaleur, dans l'étude précédente d'influence de la température lors du contact Triton-PSM.

Nous verrons dans la seconde partie de ce travail que l'activité ATPasique totale du complexe ATPasique peut être augmentée de 150 % par chauffage à 40°C .

Nous discuterons alors ce phénomène. Nous pouvons cependant retenir que la congélation permet de conserver intact l'extrait au Triton pendant quelques jours. A 4 ou à 22°C la sensibilité à l'oligomycine disparaît rapidement ; ce phénomène pourrait être dû à une dissociation du complexe ATPasique à ces températures.

b) Milieu de conservation.

La purification du complexe ATPasique nécessite un milieu liquide. Nous avons donc cherché un milieu susceptible de préserver l'activité sensible à l'oligomycine à $+22^{\circ}\text{C}$ et $+4^{\circ}\text{C}$.

Le tableau 8 montre les résultats de conservation pendant 12 et 24 heures à + 22°C et + 4°C en présence de 10 % (poids/volume) de saccharose ou de glycérol. Notons que la conservation de l'activité ATPasique sensible à l'oligomycine est légèrement favorisée par le glycérol mais pas par le saccharose dans ces conditions.

Par contre, la présence de glycérol empêche l'inactivation de l'ATPase totale à + 4°C. Cette protection par le glycérol a été décrite par Racker pour le facteur F_1 extrait des PSM de coeur de boeuf (63).

Cette protection contre l'action du froid est due aux fonctions alcool du glycérol car d'autres alcools ont la même propriété (63).

IV - PURIFICATION DU COMPLEXE ATPasique SENSIBLE A L'OLIGOMYCINE

Après avoir défini les conditions optima de solubilisation du complexe ATPasique sensible à l'oligomycine par le Triton X-100 à partir des PSM de S. pombe cultivée en milieu glycérol, nous avons purifié ce complexe par centrifugation en gradient de densité.

L'essai d'un gradient glycérol linéaire de 4 à 20 % a permis une bonne purification de l'activité ATPasique (figure 7) mais seulement un tiers de celle-ci est sensible à l'oligomycine, ce qui suggère une inactivation du complexe dans le gradient.

Après centrifugation dans un gradient linéaire de saccharose (figure 8) la sensibilité à l'oligomycine est mieux conservée ; dans les fractions les plus actives, elle est supérieure à 50 % de l'activité ATPasique totale.

Ces résultats sont confirmés par les études précédentes de conservation en présence de glycérol et de saccharose recalculées sur le tableau 9.

En fait, il semble que la proportion plus faible de sensibilité à l'oligomycine dans le cas du gradient glycérol soit dû, non à une dégradation plus intense du complexe enzymatique en présence de glycérol, mais à une préservation contre le froid de l'activité ATPasique totale non sensible à l'oligomycine (préservation du facteur F_1).

Les gradients de densité réalisés permettent d'éliminer une forte proportion de protéines légères ne présentant pas d'activité ATPasique sensible à l'oligomycine chez S. pombe cultivée en milieu glycérol.

Nous avons obtenu une purification de l'ordre de 40 fois par rapport à l'homogénat cellulaire et un rendement d'extraction très faible, de l'ordre de 3 % (tableau 10). L'activité spécifique obtenue est comparable à celle rapportée par Tzagoloff pour S. cerevisiae (87).

Deuxième partie :

MODIFICATIONS DE L'ACTIVITE ATPasique MITOCHONDRIALE

- I . Modification par la répression glucose chez S. pombe.
- II . Modification génétique chez S. pombe.
- III . Action du DCCD sur l'activité du complexe ATPasique de S. pombe.
- IV . Action du DCCD chez différents organismes.
- V . Actions comparées du DCCD et de la chaleur.
- VI . Action du chlorure d'étain tributylé.
- VII . Action de la trypsine.

I - MODIFICATION DE L'ACTIVITE ATPasique MITOCHONDRIALE PAR LA REPRESSION GLUCOSE CHEZ S. POMBE.

Nous envisagerons l'effet glucose sur l'activité ATPasique de S. pombe parallèlement à l'étude du mutant M 126 (paragraphe suivant).

La répression par le glucose est une forme particulière de la répression catabolique connue depuis très longtemps chez les bactéries et les levures (91).

Ephrussi et al (18) ont montré que lorsque la levure S. cerevisiae est cultivée en milieu très concentré en glucose, sa respiration diminue et les pics d'absorption des cytochromes diminuent. La répression par le glucose s'exerce sur un grand nombre d'enzymes mitochondriales mais de façon très inégale (5 - 33).

Notons que les mécanismes qui sont à l'origine de la répression glucose, commencent à être connus chez les bactéries (91). Ces mécanismes sont étudiés actuellement chez S. pombe (21).

Avant d'étudier les propriétés ATPasique de S. pombe cultivée en milieu glucose nous avons donc dû revoir notre technique de préparation de particules submitochondriales utilisée dans le cas de S. pombe cultivée en milieu glycérol.

En effet, la figure 9 montre que dans des conditions identiques de broyage la répartition des éléments subcellulaires est différente selon le milieu de culture (la représentation utilisée permet d'associer la surface de chaque fraction au pourcentage d'activité enzymatique par rapport à l'homogénat).

Pour les cellules cultivées en milieu glycérol, la fraction mitochondriale sédimente en majeure partie à 10 000 g. Les autres fractions sont relativement peu contaminées par les marqueurs enzymatiques mitochondriaux. Mais dans le cas des cellules cultivées en milieu glucose, la fraction 10 000 g est très réduite au profit des fractions 30 000 et 100 000 g. Les deux lots de cellules ayant été soumises au même broyage, cette expérience permet de conclure que les mitochondries des cellules cultivées sur glucose sont moins denses ou plus fragiles que celles des cellules cultivées sur glycérol. La microscopie électronique devrait permettre de définir cette différence avec précision, de même qu'elle a permis de montrer que la levure S. cerevisiae cultivée en anaérobiose renferme moins de mitochondries qu'en aérobiose mais d'un volume supérieur (Mrena E. et Goffeau A., communication personnelle).

Parallèlement, Neal (56) a montré que les cellules de S. cerevisiae réprimées par le glucose contiennent de larges mitochondries de densité inférieure à celles des mitochondries de cellules déréprimées.

Quoi qu'il en soit, dans le cas des cellules cultivées sur glucose, la préparation des particules submitochondriales a été légèrement modifiée : l'homogénat de cellules-glucose, est centrifugé à 100 000 g pendant une heure au lieu de 10 000 g pendant 30 mn pour les cellules-glycérol.

Notons qu'il est possible de purifier les PSM de S. pombe cultivée en milieu glucose, sur un gradient linéaire de saccharose (figure 10).

Dans le cas présenté, partant de PSM d'activité spécifique 2,3, l'activité spécifique obtenue après gradient est de 3,4, soit un enrichissement de 40 %. Mais les rendements sont trop faibles pour être utilisables dans des études nécessitant beaucoup de matériel. Notons cependant que des techniques de centrifugation en gradient de densité permettent de séparer la membrane interne de la membrane externe des mitochondries de levure (3), ou de purifier les particules submitochondriales de coeur de boeuf (32).

II - MODIFICATION GENETIQUE DE L'ATPase MITOCHONDRIALE CHEZ S. POMBE : ETUDE DU MUTANT M 126.

Le mutant M 126 a été obtenu par inactivation aux rayons X de S. pombe 972 h- (26). Les analyses génétiques ont montré que cette mutation est d'origine nucléaire (26 - 27). Ce mutant ne pousse pas sur glycérol, nous le comparerons donc à la souche sauvage cultivée sur glucose. En conséquence, nous envisagerons parallèlement l'effet de la répression glucose sur l'activité ATPasique mitochondriale.

Notons auparavant que la respiration de M 126 est nulle quelque soit la phase de croissance (tableau 11).

Cette absence de respiration semble partiellement compensée par une augmentation de la fermentation. D'autre part, chez la souche sauvage, la consommation d'oxygène est deux fois plus faible lorsque la culture est effectuée sur glucose au lieu de glycérol. Les figures 11 et 12 (spectres réalisés par F. Foury sur nos préparations) rappellent (27) que les pics d'absorption du cytochrome a + a₃ (605 nm) n'est pas détectable chez M 126 ; le cytochrome b (bande α 560 nm) est présent à l'état de traces ; le cytochrome c (bande α 1 548 nm et bande α 2 545 nm) et le cytochrome c₁ (bande α 554 nm) sont fortement diminués. La souche sauvage cultivée sur glycérol présente des concentrations de cytochromes plus élevées que sur glucose.

D'autre part, les spectres effectués sur les particules submitochondriales montrent une diminution considérable de la concentration en cytochrome c. Cette protéine relativement peu fixée au reste de la membrane est libérée lors de la préparation des PSM.

Le tableau 12 rappelle (27) les activités ATPasiques des homogénats de S. pombe cultivée en milieu glucose et en milieu glycérol et du mutant M 126 cultivé en milieu glucose.

La souche sauvage présente une activité ATPasique deux fois plus faible lorsqu'elle est cultivée en milieu glucose, au lieu de glycérol, mais l'oligomycine a une action comparable dans ces deux cas. Cependant chez M 126, l'activité ATPasique est très faible et insensible à l'oligomycine. Selon les travaux de Tzagoloff (84) sur S. cerevisiae, la sensibilité de l'ATPase mitochondriale à l'oligomycine nécessite la présence de l'OSCP et de l'ensemble des «facteurs intrinsèques».

L'insensibilité à l'oligomycine de l'ATPase de M 126 suggère donc une absence ou un manque d'activité d'un ou plusieurs éléments nécessaires à la sensibilité à l'oligomycine.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons isolé des particules submitochondriales de la souche sauvage et de M 126 cultivées en milieu glucose selon la méthode mise au point dans le chapitre précédent.

Nous avons obtenu des activités ATPasiques spécifiques de 1,5 à 4 avec la souche sauvage et de 0,6 à 1,3 avec le mutant M 126.

Cette reproductibilité médiocre a été discutée précédemment. La figure 13 montre que l'activité ATPasique des PSM de M 126 est insensible à l'oligomycine et au DCCD quelles que soient les concentrations utilisées.

Ces résultats permettent d'éliminer l'hypothèse d'une insensibilité due à des conditions particulières de perméabilité chez le mutant par rapport à la souche sauvage (26). Par contre, l'activité ATPasique des PSM de M 126 et de la souche sauvage sont sensibles à l'antibiotique Dio 9 qui contrairement à l'oligomycine ou au DCCD agit directement sur le facteur F_1 (70 - 71).

Nous avons tenté ensuite d'extraire le complexe ATPasique chez M 126 parallèlement à la souche sauvage cultivée en milieu glucose. En appliquant les modalités d'extraction et de purification mises au point sur S. pombe cultivée en milieu glycérol, nous avons obtenu dans le cas d'une culture en milieu glucose, une purification de l'ATPase totale de 20 fois par rapport à l'homogénat (tableau 13). Ce facteur de purification est deux fois plus faible que dans le cas de S. pombe cultivée en milieu glycérol. L'extraction par le Triton entraîne une diminution d'activité spécifique. Les conditions d'action du Triton devront donc être adaptées à ce cas. Cependant la même technique d'extraction par le Triton X-100 appliquée au mutant M 126 ne nous a pas permis de solubiliser l'ATPase membranaire de cet organisme, bien qu'un taux de protéine comparable à la souche sauvage soit extrait. Nous avons donc pensé que la solubilisation de l'ATPase de M 126 serait possible en modifiant les deux principaux paramètres de l'action du Triton : le pH et la concentration de détergent.

La figure 14 montre l'action de quantités croissantes de Triton sur la solubilisation des protéines de l'ATPase chez la souche sauvage et le mutant, cultivés en milieu glucose. De 0 à 0,5 mg de Triton par mg de protéines membranaires, l'extraction des protéines est comparable chez les deux organismes. Pour les quantités supérieures de détergent, l'extraction des protéines atteint 75 % dans le cas de la souche sauvage ; mais ces concentrations élevées n'entraînent pas de solubilisation accrue dans le cas de M 126. Le maximum de solubilisation des protéines dans ce cas ne dépasse pas 55 %. D'autre part, les mesures d'activités ATPasiques montrent que l'ATPase membranaire de M 126 quelle que soit la quantité du Triton utilisée, n'est pas solubilisée, alors que dans le cas de la souche sauvage la solubilisation de l'ATPase est proportionnelle à la quantité de Triton présente.

De même, la figure 15 montre que le pH du milieu d'extraction influence peu la solubilisation de l'ATPase des PSM de M 126, alors que cette solubilisation est très sensible au pH dans le cas de la souche sauvage. Ces résultats suggèrent que l'ATPase membranaire de M 126 pourrait être concentrée dans le culot lors de l'extraction par le Triton. En fait, nous avons vu précédemment que l'action du Triton entraîne une dénaturation partielle de l'ATPase, et de l'activité spécifique de l'ATPase du culot obtenu est peu ou pas augmentée. Cette inextractibilité de l'ATPase par le Triton, indique une structure du complexe ATPasique de M 126 différente de celle du complexe de la souche sauvage. Les liaisons physico-chimiques assurant la cohésion de cette enzyme au reste de la membrane semblent renforcées et inaltérables par le Triton X-100.

III - EFFETS DU DCCD SUR L'ATPase MITOCHONDRIALE DE S. POMBE CULTIVÉE EN MILIEU GLYCEROL.

Le dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) est un agent deshydratant très actif utilisé notamment dans la synthèse des polymères.

Les faibles concentrations de DCCD (1 à 5 n moles par mg de protéines), inhibent l'activité ATPasique de la membrane mitochondriale interne du coeur de boeuf et du foie de rat (6, 7, 10). Cette inhibition semble résulter d'une liaison covalente (1, 2) entre le DCCD et une lipoprotéine de poids moléculaire 10 000 (13) ou 13 000 (78).

La grande réactivité de ce composé laisse supposer une action plus complexe à forte concentration. En fait, à des concentrations d'environ 20 n moles de DCCD par mg de protéine, plusieurs sites de fixation non spécifiques, dont le facteur F_1 , ont été observés dans les PSM de coeur de boeuf (57, 78). Beyer et al (8) ont montré qu'une concentration de 267 n moles de DCCD par mg de protéine, inhibe le transfert d'électron dans les PSM de coeur de boeuf par action sur un site localisé entre la NADH deshydrogénase et le cytochrome b.

Les effets de concentrations supérieures de DCCD n'ont jamais été étudiées. Nous avons étudié l'action de ce composé à différentes concentrations sur les PSM, le complexe ATPasique et le facteur F_1 de S. pombe.

La figure 16 montre que lorsque le DCCD est ajouté directement au milieu de dosage, l'activité ATPasique de PSM isolée de S. pombe cultivée en milieu glycérol est inhibée à 50 % par 25 μ M de DCCD (soit 1,25 μ moles de DCCD par mg de protéine).

Mais à des concentrations supérieures cette inhibition diminue progressivement pour pratiquement s'annuler à 100 μ M de DCCD (soit 5 μ moles de DCCD par mg de protéine) et aux concentrations supérieures.

Dans le cas de l'extrait au Triton l'inhibition de l'activité ATPasique par les faibles concentrations de DCCD est semblable au cas des PSM, mais les hautes concentrations de DCCD stimulent réellement cette activité : en absence de DCCD l'activité spécifique est de 6,8 pour 8,9 en présence de 250 μ M de DCCD, soit une stimulation de 30 %.

Ces résultats suggèrent qu'un facteur responsable de la stimulation par le DCCD est extrait par le Triton avec le complexe ATPasique. Les mêmes résultats ont été obtenus avec le complexe ATPasique purifié sur gradient saccharose (résultats non montrés). D'autre part, la figure 17 montre que l'activité ATPasique du facteur F_1 est insensible au DCCD quelles que soient les concentrations utilisées. Dans ce cas une légère stimulation est observée par l'oligomycine.

Ces résultats montrent donc que les effets d'inhibition et de stimulation du DCCD ne paraissent pas dus à une action sur les sous unités du facteur F_1 mais semblent liés à la présence de la partie régulatrice de l'enzyme.

De plus, la figure 18 montre que l'oligomycine n'a plus d'action en présence des fortes concentrations de DCCD.

Par contre, le Dio 9, agissant directement au niveau du facteur F_1 (70, 71) inhibe le complexe ATPasique quelles que soient les concentrations de DCCD présentes (figure 18).

Ces résultats permettent donc de supposer que le DCCD, à hautes concentrations, bloque le site d'action de l'oligomycine ou atteint l'intégrité du complexe ATPasique de telle manière que l'action inhibitrice de l'oligomycine ne soit plus possible.

IV - EFFETS DU DCCD SUR LES ATPases MITOCHONDRIALES DE DIFFERENTES ORIGINES.

L'effet de stimulation du DCCD n'ayant jamais été décrit, nous avons vérifié que cette stimulation n'est pas une propriété propre à S. pombe cultivée sur glycérol.

Nous avons préparé des PSM à partir de mitochondries isolées de la levure S. cerevisiae cultivée en milieu éthanol, et de mitochondries de foie de rat.

La figure 19 montre que chez S. cerevisiae, le DCCD n'entraîne pas de stimulation de l'activité ATPasique des PSM ou de l'extrait au Triton. Par contre, dans les extraits au Triton de foie de rat et de S. pombe cultivée en milieu glucose, les effets du DCCD sont comparables à ceux décrits pour S. pombe cultivée en milieu glycérol.

Dans le cas des PSM de ces organismes, les fortes concentrations de DCCD ont une action inhibitrice plus marquée que chez S. pombe glycérol.

Quatre types de réponses aux hautes concentrations de DCCD peuvent donc être distinguées :

- 1 - Stimulation des PSM et du complexe ATPasique (S. pombe-glycérol).
- 2 - Faible stimulation des PSM, mais stimulation du complexe ATPasique (S. pombe-glucose et foie de rat).
- 3 - Absence de stimulation des PSM et du complexe ATPasique (S. cerevisiae).
- 4 - Absence de stimulation accompagnée d'absence d'inhibition (facteur F_1 de S. pombe et PSM de M 126).

Ces observations confirment donc que l'activité de facteur(s) responsable(s) de la stimulation de l'activité ATPasique par le DCCD est généralement augmentée par l'extraction au Triton, mais peut varier selon l'origine biologique des mitochondries.

Ce ou ces facteurs seraient moins actifs dans les PSM et inactifs ou absents chez S. cerevisiae.

D'autre part, le tableau 14 montre qu'il existe un rapport inverse entre l'inhibition par les faibles concentrations de DCCD ou l'inhibition par l'oligomycine et la stimulation par les hautes concentrations de DCCD : lorsque l'inhibition par l'oligomycine est très prononcée (supérieure à 80 %) la stimulation par le DCCD n'est pas observée ; cette stimulation n'est apparente que lorsque l'inhibition par l'oligomycine est inférieure à 80 %.

V - EFFETS COMPARES DE LA CHALEUR ET DU DCCD.

De nombreux auteurs ont montré que l'activité de l'ATPase mitochondriale peut être activée par incubation de quelques minutes à 60-65°C (58 - 82).

Pour pouvoir mieux étudier ce phénomène nous avons choisi un traitement à 40°C pendant 5 à 60 mn.

a) Cas de *S. pombe* cultivé en milieu glycérol.

La figure 20 montre que le traitement de PSM de *S. pombe*-glycérol à 40°C stimule fortement l'activité ATPasique. Pendant les 10 premières minutes de traitement, l'augmentation d'activité ATPasique sensible à l'oligomycine est parallèle à celle de l'ATPase totale.

Pour des traitements plus prolongés l'activité sensible à l'oligomycine diminue, mais l'activité totale continue à augmenter légèrement.

Ce résultat montre que la stimulation par des traitements modérés à la chaleur n'est pas due à une inactivation d'un facteur nécessaire à la sensibilité de l'oligomycine.

Cependant, l'extrait au Triton est plus sensible au traitement par la chaleur (figure 20).

La stimulation de l'ATPase totale est plus intense que dans le cas des PSM, la sensibilité à l'oligomycine est fortement altérée.

Nous pouvons donc conclure de ces résultats, que la chaleur stimule l'activité ATPasique de *S. pombe* ; mais lorsque le traitement à la chaleur est prolongé, ou lorsque l'enzyme n'est plus «protégée» par son environnement membranaire, la chaleur semble dissocier (ou inactiver) certains facteurs nécessaires à l'action de l'oligomycine. D'autre part, le ou les facteurs responsables de cette stimulation par la chaleur sont étroitement associés à l'enzyme puisque le complexe ATPasique purifié présente ce phénomène de stimulation (résultats non montrés).

La figure 21 montre l'action de quantités croissantes de DCCD sur des PSM ou un extrait au Triton préalablement chauffé pendant 20 mn à 40°C.

Dans le cas de l'extrait au Triton, le DCCD, quelle que soit la quantité utilisée, n'a plus d'action notable. Comme pour l'oligomycine l'effet inhibiteur du DCCD est donc fortement diminué.

D'autre part, l'effet de stimulation n'est plus apparent. Ceci peut être expliqué en supposant soit que l'activité potentielle de l'enzyme est totalement exprimée sous l'effet du traitement à la chaleur, le DCCD ne peut avoir alors d'effet additif, soit que la chaleur a entraîné une dissociation ou une inactivation du ou des facteurs responsables de la stimulation par le DCCD.

Dans le cas des PSM, après traitement modéré à la chaleur, le DCCD a un effet inhibiteur quelle que soit la quantité utilisée.

Nous avons vu précédemment que l'ATPase intégrée dans la membrane est mieux «protégée» contre l'effet dénaturant de la chaleur.

Ce résultat semble également indiquer que le traitement modéré à la chaleur n'a pas dissocié le complexe en entraînant une inactivation des inhibiteurs agissant sur les facteurs extérieurs à la partie catalytique de l'enzyme. L'effet de stimulation du DCCD étant moins intense que celui de la chaleur, il n'apparaît plus dans cet essai.

Ces résultats semblent donc montrer que la chaleur et le DCCD à concentration élevée, ont le même point d'impact sur le complexe ATPasique. Comme pour le DCCD, nous n'avons observé aucun effet de la chaleur sur le facteur F_1 purifié (résultats non montrés).

b) Effets de la chaleur sur l'activité ATPasique de différents organismes.

- Cas de *S. cerevisiae* et du foie de rat :

La figure 22 montre que chez *S. cerevisiae*, l'activité ATPasique des PSM n'est pas stimulée par la chaleur, mais au contraire légèrement inhibée. Cependant, comme chez *S. pombe* l'oligomycine inhibe moins l'activité ATPasique des PSM chauffées. Dans le cas de l'extrait au Triton, une légère stimulation (20 %) de l'activité ATPasique est observée ainsi qu'une diminution drastique de l'inhibition par l'oligomycine.

Chez le foie de rat (figure 22) la stimulation par la chaleur est moins intense mais qualitativement identique à celle montrée chez *S. pombe* cultivée en milieu glycérol.

- Cas de *S. pombe* cultivée en milieu glucose et du mutant M 126 :

La figure 23 montre que lorsque les PSM ou l'extrait au Triton de *S. pombe* glucose sont incubées à 40°C l'activité ATPasique est stimulée.

Par contre, l'activité ATPasique des PSM de M 126 est inhibée à 40°C.

Cette absence de stimulation chez M 126 est donc une propriété supplémentaire de ce mutant.

Mais la figure 23 montre l'effet de la chaleur sur le culot obtenu après effet du Triton X-100 sur les PSM de *S. pombe* cultivée en milieu glucose.

L'activité de ce culot est inhibée par la chaleur. D'autre part, l'oligomycine a une action faible sur son activité ATPasique. Il semble donc que ce culot soit assez similaire aux PSM, bien qu'il conserve une activité ATPasique, cette activité est peu inhibée par l'oligomycine, mais fortement inhibée par la chaleur. Il faut noter que ceci n'a pu être reproduit à partir de PSM de *S. pombe* cultivée sur milieu glycérol.

Dans ce cas, le culot après une ou plusieurs extractions au Triton reste stimuable par la chaleur et sensible à l'oligomycine.

D'autre part la figure 24 montre que le culot obtenu après action du Triton sur les PSM de *S. pombe* glucose est inhibé par le DCCD quelles que soient les concentrations utilisées. La stimulation, légèrement apparente dans les PSM n'est plus observée dans le culot après extraction au Triton.

L'ensemble de ces résultats montrent donc un parallélisme entre la stimulation par les fortes concentrations de DCCD et la stimulation par la chaleur. Il est donc permis de supposer un mécanisme commun à ces deux effets. Cependant, par action du sulfate d'ammonium sur le complexe ATPasique de *S. pombe*, il est possible de différencier ces deux effets.

c) Action du sulfate d'ammonium sur le complexe ATPasique des levures

Lorsqu'un extrait au Triton est fraîchement préparé et saturé à 80 % en sulfate d'ammonium, on obtient, après centrifugation, non pas un précipité, mais une fine pellicule à la surface du liquide. Cette pellicule peut être mise en suspension dans le «milieu d'extraction».

Le tableau 15 montre chez S. pombe qu'après ce traitement, l'ATPase extraite conserve ses propriétés d'inhibition par l'oligomycine.

De plus, l'activité spécifique après traitement au sulfate d'ammonium est supérieure de 35 % par rapport à celle de l'extrait au Triton d'origine. Cette activité spécifique supérieure peut être due soit à une purification du complexe ATPasique, soit à une stimulation de l'activité de ce complexe. La présence de sulfate d'ammonium rend difficile une vérification expérimentale permettant de confirmer une de ces hypothèses.

Quoi qu'il en soit, nous avons testé l'effet de la chaleur sur le complexe ATPasique ainsi traité.

La figure 25 montre que après ce traitement, l'activité ATPasique n'est plus stimulée par la chaleur mais au contraire nettement inhibée. De plus, la diminution de l'activité ATPasique sensible à l'oligomycine est parallèle à celle de l'activité ATPasique totale.

Par contre, nous n'avons noté aucune différence de réactivité au DCCD pour le complexe ATPasique traité au sulfate d'ammonium (résultats non montrés).

Le sulfate d'ammonium paraît donc avoir sur le complexe ATPasique de S. pombe une action élective sur le mécanisme de stimulation par la chaleur : cette stimulation n'est plus possible et la sensibilité à l'oligomycine n'est plus détruite par la chaleur. Mais le sulfate d'ammonium, n'atteint pas les mécanismes d'inhibition et de stimulation par le DCCD ou l'oligomycine. D'autre part, la figure 26 montre que la réactivité à la chaleur de l'extrait au Triton de S. cerevisiae n'est pas modifiée par le traitement au sulfate d'ammonium.

d) Mise en évidence d'une dissociation du complexe ATPasique par la chaleur et le DCCD à hautes concentrations.

L'ensemble des résultats précédents semblent montrer que les facteurs du complexe ATPasique nécessaires à la sensibilité à l'oligomycine sont inactivés ou dissociés du facteur F_1 , par la chaleur et le DCCD à hautes concentrations.

Les résultats suivants montrent que la chaleur ou le DCCD à hautes concentrations entraînent une réelle dissociation du complexe ATPasique.

En effet, la figure 27 A, rappelle que lorsque l'extrait au Triton est purifié sur un gradient linéaire de saccharose de 10 à 25 %, deux pics d'activité ATPasique peuvent être observés. Le pic correspondant à la fraction 3 présente une sensibilité à l'oligomycine de 50 %, alors que le pic correspondant à la fraction 6 est moins sensible à l'oligomycine. De plus des études en gel de polyacrylamide (voir troisième partie) montrent que la fraction 3 représente un complexe ATPasique «pur» alors que la fraction 6 est largement contaminée. Cette fraction pourrait comprendre le facteur F_1 libre et d'autres protéines. Or lorsque l'extrait au Triton est chauffé (figure 27 B) ou traité par du DCCD (figure 27 C) avant passage sur gradient, le pic correspondant au complexe ATPasique purifié (fraction 3) disparaît.

Cette absence de fraction dense montre donc que le complexe ATPasique a été dissocié par le traitement à la chaleur ou au DCCD.

Notons que le décalage du pic d'activité dans le cas de l'extrait au Triton prétraité au DCCD (fraction 5 au lieu de 6), pourrait être interprété comme une dissociation partielle du complexe ATPasique.

Nous avons tenté de mettre en évidence ces dissociations dans le cas de particules submitochondriales.

Le tableau 16 montre que après traitement à la chaleur 6 % des protéines et 4,5 % de l'activité ATPasique sont libérées de la membrane. Mais cette libération n'a pu être mise en évidence dans le cas du DCCD. L'action de la chaleur paraît donc plus drastique que celle du DCCD.

VI - EFFETS DU CHLORURE D'ETAIN TRI BUTYLE (TBTC) SUR L'ATPase MITOCHONDRIALE DE S. POMBE.

Tzagoloff et al (81) et Byington (11) ont signalé que le TBTC, inhibiteur de l'ATPase de coeur de boeuf à faible concentration (10^{-6} M) inhibe moins cette enzyme à concentrations plus élevée.

Nous avons étudié l'action de ce composé chez S. pombe cultivée en milieu glycérol, et chez S. cerevisiae.

La figure 28 montre que le TBTC inhibe l'activité ATPasique d'un extrait du Triton de S. pombe-glycérol à 10^{-7} M.

A concentration supérieure (10^{-5} M à 10^{-4} M) une stimulation de l'activité ATPasique est observée comme dans le cas du DCCD. Mais contrairement à celui-ci cette stimulation est suivie d'une nouvelle zone d'inhibition pour les concentrations supérieures à 10^{-4} M. Nous expliquons cette dernière inhibition en constatant que le TBTC, contrairement au DCCD, peut agir sur le facteur F_1 purifié.

D'autre part, l'action du TBTC sur l'extrait au Triton des PSM de S. cerevisiae est très différente de celle montrée chez S. pombe (figure 28).

Le TBTC semble donc agir sur le complexe ATPasique de S. pombe selon trois modes différents :

- inhibition directe par action sur le facteur F_1 ;
- inhibition indirecte par action sur un ou plusieurs facteurs intrinsèques ;
- stimulation par action comparable à celle de la chaleur et du DCCD.

Les sites d'action du TBTC situé sur les facteurs intrinsèques auraient une affinité plus élevée pour ce composé que ceux situés sur le facteur F_1 .

VII - ACTION DE LA TRYPSINE SUR L'ATPase MITOCHONDRIALE.

Pullman et Monroy (59) d'une part, et Racker (31) d'autre part ont isolé des mitochondries de coeur de boeuf un inhibiteur protéique de l'activité ATPasique mitochondriale.

Cet inhibiteur peut être inactivé par traitement à la trypsine.

Horstman et Racker (31) ont remarqué que certaines préparations de facteur F_1 peuvent inhiber l'activité ATPasique des PSM de coeur de boeuf. De plus, cette inactivation peut être observée avec du facteur F_1 inactivé par le froid (31).

Récemment Knowles et Penefsky (40) ont isolé chaque sous unité du facteur F_1 de coeur de boeuf. Ils ont montré que la sous unité de plus faible poids moléculaire (tableau B) présente des propriétés physiques identiques à celle de l'inhibiteur de Pullman et Monroy ou d'Horstman Racker. Cet inhibiteur protéique sensible à la trypsine serait donc étroitement lié à l'ATPase mitochondriale de coeur de boeuf.

Nous avons étudié l'action de la trypsine sur le facteur F_1 et le complexe ATPasique de S. pombe.

Dans ces expériences les échantillons sont incubés à 22°C en présence de trypsine. L'action de la trypsine est bloquée en ajoutant de l'inhibiteur de la trypsine extrait du soja.

La figure 29 montre l'action de la trypsine sur le facteur F_1 purifié, de S. pombe cultivée en milieu glycérol. Pour des quantités de trypsine inférieures à 40 μ g (pour 50 μ g de facteur F_1), une stimulation de l'activité ATPasique de 16 % a été obtenue. Pour des concentrations supérieures de trypsine (ou des temps d'incubation prolongés), l'activité ATPasique est inhibée. Il semble donc que la trypsine ayant inactivé l'inhibiteur protéique présent dans le facteur F_1 , l'activité de ce facteur soit stimulée.

A fortes concentrations, la trypsine pourrait avoir un effet lytique sur les autres sous unités de l'enzyme et entraîner aussi une dégradation progressive et donc une inactivation.

D'autre part, la figure 29 montre l'action de la trypsine sur le complexe ATPasique non purifié (extrait au Triton) isolé à partir de PSM de S. pombe cultivée en milieu glycérol.

De faibles quantités de trypsine (inférieures à 5 μ g pour 500 μ g d'extrait au Triton) inhibent de 20 à 40 % l'activité ATPasique de l'extrait au Triton. Cette inhibition diminue progressivement entre 5 et 20 μ g de trypsine. Des quantités de trypsine supérieures à 20 μ g dans les conditions utilisées stimulent l'activité ATPasique de l'extrait au Triton X-100 de S. pombe.

Cette stimulation varie de 25 à 60 % selon les expériences. Ces résultats sont qualitativement reproductibles, mais quantitativement variables.

Nous expliquons cette variation quantitative en constatant que l'activité ATPasique d'un extrait au Triton trypsiné est rapidement inhibée par le froid (tableau 17). Les mesures doivent donc être faites immédiatement après l'action de la trypsine.

La figure 29 montre d'autre part que le traitement à la trypsine entraîne une diminution de l'inhibition par l'oligomycine. Pour les quantités les plus élevées de trypsine, l'oligomycine n'a pratiquement plus d'action.

D'autre part, le tableau 17 montre que lorsque l'activité ATPasique de l'extrait au Triton est stimulée par le traitement à la trypsine, une incubation à la chaleur n'a plus d'action stimulante. De même le DCCD n'a pas d'effet sur un extrait au Triton trypsiné (résultats non montrés).

L'ensemble de ces observations (stimulation de l'activité ATPasique-inhibition par le froid - absence d'inhibition par l'oligomycine - absence d'effet de la chaleur et du DCCD, après effet de la trypsine sur le complexe ATPasique) permettent donc de conclure que la trypsine dissocie le facteur F_1 des autres sous unités du complexe ATPasique comme la chaleur et le DCCD à hautes concentrations.

La figure 29 montre que l'action de la trypsine sur l'extrait au Triton de S. cerevisiae est différente de celle montrée chez S. pombe : chez S. cerevisiae nous n'avons pas observé de stimulation de l'activité ATPasique par action de la trypsine.

L'ensemble de ces résultats semble montrer que le DCCD et le TBTC pourraient, comme la chaleur et la trypsine, stimuler l'activité de l'ATPase mitochondriale par action sur un inhibiteur protéique inclus dans cette enzyme. Les résultats présentés sont comparables chez la levure S. pombe et le foie de rat.

Mais chez la levure S. cerevisiae et le mutant M 126 de S. pombe les actions de ces divers agents différent : l'inhibiteur protéique de l'ATPase pourrait être absent ou inactif chez ces souches. Après avoir étudié la structure quaternaire de l'ATPase mitochondriale de Schizosaccharomyces pombe (troisième partie) nous discuterons l'ensemble des résultats de ce travail (conclusion).

Troisième partie :

STRUCTURE QUATERNAIRE DE L'ATPase MITOCHONDRIALE DE S. POMBE.

- I . Facteur F_1 .
- II . Complexe ATPasique.
- III . Profils électrophorétiques des particules submitochondriales.

Nous avons appliqué la méthode électrophorétique en présence de SDS de Weber et Osborn (94) légèrement modifiée à l'étude de la structure quaternaire de l'ATPase de *S. pombe*. La technique originale (94) effectue le traitement au SDS (1 %) en présence de mercaptoéthanol (1 %) en tampon phosphate pH 7 pendant 2 heures à 37°C, suivi d'une dialyse de plusieurs heures contre un tampon phosphate pH 7 contenant 0,1 % de SDS et 0,1 % de mercaptoéthanol. De nombreux auteurs préfèrent un traitement de quelques minutes à 100°C et négligent la dialyse. Ce traitement à chaud accélère l'action du SDS sur les protéines (65). Pour une estimation relative des sous unités, il faut préférer la lecture en lumière ultra-violet sans coloration préalable ou la coloration à l'amido-black (73). En effet, le bleu de Coomassie souvent utilisé ne se fixe pas proportionnellement à la concentration en protéines. La décoloration peut être facilitée par électrophorèse. L'électrophorèse longitudinale a tendance à déformer légèrement les bandes colorées, empêchant ensuite une bonne intégration. L'électrophorèse transversale est rapide mais nécessite des cuves de grandes dimensions. Nous avons préféré accélérer la décoloration par un chauffage modéré (voir « matériel et méthodes »).

I - STRUCTURE QUATERNAIRE DU FACTEUR F_1 DE *S. POMBE*.

Le facteur F_1 de *S. pombe* cultivé en milieu glycérol et glucose et du mutant M 126 a été extrait et purifié par A. Goffeau (27) par la méthode de Tzagoloff (82) modifiée (27). Le tableau 18 rappelle les étapes de purification et les activités spécifiques obtenues (27). Nous avons étudié la composition en sous unités de cette forme de l'ATPase mitochondriale.

Les résultats obtenus pour le facteur F_1 de *S. pombe* cultivée en milieu glycérol sont reportés sur la figure 30.

Cinq sous unités peuvent être distinguées.

Leurs poids moléculaires sont calculés par rapport à un gel témoin contenant 4 protéines monomériques de poids moléculaires connus (figure 31) ou par comigration du facteur F_1 et des témoins (figure 32). Les résultats obtenus par ces deux méthodes sont semblables :

- A : 60 500 $\pm$ 1 500
- B : 58 000 $\pm$ 1 500
- C : 32 500 $\pm$ 1 000
- D : 13 500 $\pm$ 1 000
- E : 8 000 $\pm$ 1 500

Le tableau 19 permet de comparer les valeurs trouvées chez *S. pombe* à d'autres espèces. Les poids moléculaires que nous avons déterminés chez *S. pombe* sont similaires à ceux décrits pour les cinq sous unités des ATPases de coeur de boeuf ou de foie de rat. Seules les valeurs obtenues par Tzagoloff chez *S. cerevisiae* diffèrent par la présence d'une sous unité supplémentaire de poids moléculaire 38 500 et par l'absence de la sous unité légère de poids moléculaire 7 500. Ces différences entre deux espèces très voisines peuvent être expliquées par l'existence d'une contamination de poids moléculaire 38 500 dans la préparation de Tzagoloff, ainsi que par la non détection de l'unité de faible poids moléculaire souvent peu visible dans les gels à faibles concentrations d'acrylamide (15).

La concentration du gel en acrylamide et bis-acrylamide influence la migration et la résolution des sous unités protéiques. Ainsi Lambeth et Lardy (41) n'ont noté qu'une sous unité de haut poids moléculaire pour le facteur F_1 (tableau 19) sur un gel à 5 % d'acrylamide alors que sur un gel à 10 %, deux sous unités sont nettement séparées comme le montrent Senior et Brooks (69).

D'autre part, la détermination précise du poids moléculaire des peptides inférieurs à 10 000 daltons demande des conditions sensiblement différentes de celles que nous avons utilisées (79). Avec la méthode utilisée, il est nécessaire d'extrapoler la courbe de références pour les valeurs inférieures à 10 000 daltons.

Mais les poids moléculaires obtenus sur gel de polyacrylamide ne semblent pas refléter exactement la réalité.

En effet, récemment Knowles et al (39) ont purifié le facteur F_1 du coeur de boeuf et isolé chaque sous unité.

Ils ont comparé les poids moléculaires obtenus par la technique de SDS-gel de polyacrylamide et par une technique chromatographique de filtration sur gel (39).

Les valeurs obtenues par cette dernière technique correspondent bien à celles obtenues par centrifugation analytique ou calculées selon la composition en acides aminés. Il faut donc conclure que la technique gel de polyacrylamide-SDS surestime les sous unités de poids moléculaire élevé (33 000) et sous estime les sous unités de poids moléculaire plus faible.

Etant donné les hautes activités spécifiques obtenues pour le facteur F_1 de S. pombe cultivée en milieu glycérol (tableau 18), nous avons tenu à vérifier la pureté de cette enzyme. Cette pureté est spécialement importante pour l'obtention d'anticorps spécifiques permettant l'utilisation de techniques immunologiques.

En déposant sur un gel de polyacrylamide une quantité élevée de F_1 , nous avons mis en évidence la présence d'impuretés de poids moléculaires divers dans cette préparation (figure 33).

La préparation d'anticorps spécifique nécessite donc une purification plus intense du facteur F_1 .

D'autre part, la figure 34 montre la séparation électrophorétique des sous unités du facteur F_1 de S. pombe cultivée en milieu glucose et de M 126 (tableau 18).

Dans ces deux cas, les cinq sous unités montrées chez S. pombe cultivée en milieu glycérol sont retrouvées, mais des bandes supplémentaires contaminantes sont mises en évidence.

Dans le cas de la souche sauvage cultivée en milieu glucose, l'activité spécifique obtenue n'était que de 40, (pour 102 dans le cas du facteur F_1 isolé de la même souche cultivée en milieu glycérol) la présence de contaminants paraît donc normale.

Cependant, dans le cas du facteur F_1 de M 126, l'activité spécifique finale était de 80 ; mais les contaminants semblent plus importants que pour le facteur F_1 de la souche sauvage cultivée en milieu glucose. Il semble donc que cette activité spécifique de 80 soit surestimée, probablement par un phénomène d'activation dû au glycérol.

Notons que les concentrations relatives des sous unités du facteur F_1 paraissent sensiblement différentes chez la souche sauvage cultivée en milieu glycérol et milieu glucose. Une étude quantitative nécessiterait la mise au point d'autres techniques de coloration ; une lecture directe en lumière ultraviolette est en effet difficile sur gel de polyacrylamide.

II - STRUCTURE QUATERNAIRE DU COMPLEXE ATPasique DE *S. POMBE*.

Parallèlement, nous avons soumis à l'électrophorèse le complexe ATPasique sensible à l'oligomycine purifié précédemment (tableau 10) et dissocié par le SDS.

La figure 35 représente la séparation électrophorétique de la fraction ATPasique sensible à l'oligomycine d'activité spécifique la plus élevée (fraction 3) lors de la purification du complexe ATPasique sur un gradient de saccharose (figure 8).

Outre les cinq sous unités correspondant au facteur F_1 , il est possible de distinguer au moins sept sous unités de poids moléculaires suivants :

- | | |
|--------------|--------------|
| - a = 65 000 | - e = 20 000 |
| - b = 55 000 | - f = 17 000 |
| - c = 48 000 | - g = 9 000 |
| - d = 36 000 | |

Il est difficile de distinguer parmi ces sous unités lesquelles sont des contaminants et lesquelles sont des constituants essentiels du complexe. Nous avons trouvé des proportions relatives de sous unités a et b différentes selon les préparations. Ces peptides pourraient donc être des contaminants. Par comparaison aux travaux de Tzagoloff (87) sur *S. cerevisiae* la sous unité f pourrait correspondre à l'OSCP (poids moléculaire 18 000) et les peptides d, c et g aux facteurs membranaires intrinsèques.

Mais une purification plus poussée du complexe ATPasique sensible à l'oligomycine paraît difficile. Les phénomènes d'inactivation observés lors de l'extraction et la purification sur gradient de densité sont des facteurs limitants. Des résultats plus probants pourraient éventuellement être obtenus, par une méthode indirecte en réalisant un marquage in vivo du complexe par des acides aminés marqués, et en le précipitant sélectivement par un antisérum contre le facteur F_1 (88).

Mais nous avons vu que le facteur F_1 lui-même doit être purifié davantage dans ce but.

Notons également que lorsque des fractions du gradient saccharose, autres que la fraction 3 (figures 8, 27) correspondant au maximum de sensibilité à l'oligomycine, sont examinés en gel de polyacrylamide, de nombreux contaminants de poids moléculaires divers sont observés.

Cependant, cette étude électrophorétique semble montrer une pureté satisfaisante du complexe ATPasique examiné, bien que l'activité spécifique mesurée soit faible (30 pour l'ATPase totale et 16 pour l'activité sensible à l'oligomycine) en comparaison de l'activité spécifique de 102 mesurée dans la préparation de facteur F_1 , purifié à partir du même organisme (27).

Il semble donc que le complexe ATPasique soit en partie inactivé lors de sa préparation, ou que l'activité ATPasique potentielle n'étant pas totalement exprimée (voir les phénomènes d'activations présentés), l'activité mesurée ne soit pas comparable à celle du facteur F_1 , lui-même non activable par la chaleur ou le DCCD à hautes concentrations. Les activités spécifiques mesurées ne correspondraient donc pas à la pureté obtenue.

La connaissance de la structure quaternaire du complexe ATPasique est encore fragmentaire (78, 87) et ne permet pas encore de comparer nos résultats à ceux obtenus chez d'autres espèces, comme nous l'avons fait pour le facteur F_1 . Mais selon les travaux de Tzagoloff (86 - 90) il faut souligner que au moins une sous unité de ce complexe serait de nature lipoprotéique et ne se colorerait pas au bleu de Coomassie ; un marquage radioactif est nécessaire pour la mettre en évidence.

III - PROFILS ELECTROPHORETIQUES DES PARTICULES SUBMITOCHONDRIALES

Les études précédentes montrent que la structure quaternaire du facteur F_1 paraît semblable chez le mutant M 126 et chez la souche sauvage S. pombe 972 h .
Cependant, contrairement au facteur F_1 , le complexe ATPasique ne peut être extrait chez ce mutant. Nous avons donc tenté de visualiser l'ensemble des protéines des particules submitochondriales extraites de ces souches, sur gel de polyacrylamide après dissociation au dodécyl sulfate de sodium.

La figure 36 montre le profil électrophorétique ainsi obtenu à partir de particules submitochondriales de S. pombe cultivée en milieu glycérol. Nous avons estimé le poids moléculaire des peptides observés et, par surcharges en facteur F_1 défini les sous unités correspondant à ce facteur. Un minimum de 25 bandes peut être distingué. Ces bandes ont des poids moléculaires variant de 70 000 à 7 500, les bandes n° 7, 8, 16, 22 et 25 correspondent aux sous unités A, B, C, D et E de l'ATPase mitochondriale.

Il faut remarquer que nos préparations de particules submitochondriales renfermant vraisemblablement, en majeure partie, la membrane mitochondriale interne, mais les contaminations par la membrane mitochondriale externe et la membrane plasmique ne sont pas négligeables. Cependant dans le foie de rat et par une technique identique, Schnaitman (73) a mis en évidence 23 sous unités dans la membrane mitochondriale interne et 12 dans la membrane externe. Mais étant donné le grand nombre d'enzymes contenues dans la membrane interne, ces estimations de 23 ou 25 peptides différents paraissent faibles.

Selon J. Delhez (communication personnelle) le nombre de peptides différents de la membrane interne serait voisin de 50.

La technique utilisée ne permet d'en visualiser que la moitié.

Une plus grande résolution est donc nécessaire à une étude globale de la composition protéique des membranes, elle nécessite la mise au point de techniques plus sélectives telle que l'électrophorèse en deux dimensions en basant chaque migration sur deux principes physiques différents.

Ces restrictions étant admises, nous avons examiné le profil électrophorétique des PSM de la souche sauvage cultivée en milieu glucose et du mutant M 126 (figure 37). Par surcharge en protéines témoins et en facteur F_1 nous avons établi les correspondances apparentes entre les sous unités des trois préparations. Les profils des PSM de M 126 et de la souche sauvage cultivée en milieu glucose ne diffèrent pas sensiblement. Dans les deux cas, environ 25 bandes protéiques sont observées et les hauteurs relatives des pics sont similaires. Cette similarité ne correspond pas aux différences observées dans les activités enzymatiques et les spectres cytochromiques que nous avons montrés. Mais il est possible que chez M 126 les enzymes mitochondriales soient simplement inactivées, et que les différences protéiques de constitutions des membranes mitochondriales internes soient quantitativement mineures.

Cependant les profils électrophorétiques reproduits sur la figure 37 montrent des différences quantitatives nettes entre les PSM provenant de S. pombe cultivée en milieu glycérol et milieu glucose : les PSM provenant de S. pombe cultivée en milieu glycérol présentent des bandes N° 15 (36 000) et 24 (9 000) beaucoup plus intenses que celles observées dans les PSM de la même souche cultivée en milieu glucose.

Bien que les profils électrophorétiques diffèrent sensiblement d'une préparation à l'autre, ces différences sont toujours observées.

Ce résultat est à rapprocher des observations de Kaplan et Criddle (37) sur Saccharomyces calrsbergensis et de Fiechter et al (19) sur S. cerevisiae qui observent des différences quantitatives sur des profils électrophorétiques de PSM de levures réprimées et déréprimées.

Dans ces études les poids moléculaires n'ont pas été déterminés.

Notons que les sous unités protéiques plus intenses chez S. pombe cultivée en milieu glycérol ont un poids moléculaire comparable (36 000 et 9 000) aux sous unités d et g montrées dans le complexe ATPasique (figure 35). Une étude particulière sera nécessaire pour établir cette éventuelle similitude.

CONCLUSIONS

ACTION DU TRITON X-100 SUR LES PARTICULES SUBMITOCHONDRIALES DE LEVURE

Bien que le Triton X-100 soit utilisé depuis plusieurs années pour solubiliser les membranes des bactéries (74) et des levures (87), à notre connaissance aucune étude systématique des conditions d'action de ce détergent n'a été réalisée. Sur des particules submitochondriales de Schizosaccharomyces pombe nous avons montré que la solubilisation des protéines membranaires par le Triton X-100 est immédiate et dépend notamment :

- du rapport des concentrations Triton/protéines ;
- du pH et de la force ionique.

Dans le cas de la solubilisation des PSM de S. pombe cultivé en milieu glycérol nous avons retenus les conditions suivantes :

- 0,7 mg de Triton par mg de protéines membranaires ;
- 35 mM Tris - CH_3COOH pH 8,3 à 4°C.

Cette étude préliminaire nous a permis d'extraire et de purifier le complexe ATPasique sensible à l'oligomycine de S. pombe (44 - 48). Contrairement au cas de S. cerevisiae (87) et parallèlement à la purification du facteur F_1 de S. pombe (27), nous avons montré que l'isolement sous forme active du complexe ATPasique de S. pombe nécessite la présence d'ATP et d'EDTA.

EFFETS DE LA REPRESSION GLUCOSE SUR LES MITOCHONDRIES ET L'ATPase MITOCHONDRIALE DE LA LEVURE S. POMBE

Par centrifugation différentielle nous avons montré que les propriétés physiques des mitochondries de la levure *S. pombe* cultivée en milieu répresseur glucose semblent altérées, par rapport à la même souche cultivée en milieu glycérol. La répression glucose diminue de moitié l'activité ATPasique de particules submitochondriales de *S. pombe*. Après un lavage en présence de Triton X-100, l'activité ATPasique des particules submitochondriales de *S. pombe* réprimées par le glucose ne présente plus le phénomène de stimulation par la chaleur alors que ce phénomène persiste chez *S. pombe* cultivée en milieu glycérol, après plusieurs lavages dans les mêmes conditions.

D'autre part, nous avons montré que les PSM de *S. pombe* cultivée en milieu glycérol présentent une concentration plus élevée de deux peptides de poids moléculaires voisins de 36 000 et 9 000 daltons, comparativement aux PSM de *S. pombe* réprimée par le glucose.

Des peptides de poids moléculaires comparables font partie du complexe ATPasique. La répression glucose pourrait donc agir sur certaines sous unités du complexe ATPasique de *S. pombe*.

DEFINITION DE LA MUTATION M 126 DE S. POMBE

Nous avons complété l'étude du mutant nucléaire M 126 de *S. pombe* (26 - 27). Contrairement à la souche sauvage sensible à l'oligomycine, au DCCD et stimulée par la chaleur, nous avons montré que l'activité ATPasique des PSM de ce mutant est insensible à l'oligomycine, au DCCD et est inhibée par la chaleur. Cette altération génétique des propriétés ATPasiques est accompagnée d'une insertion différente de l'ATPase dans la membrane mitochondriale interne : le Triton X-100 s'est révélé inefficace pour extraire l'ATPase mitochondriale de ce mutant.

DEFINITION DE LA STRUCTURE QUATERNAIRE DE L'ATPase MITOCHONDRIALE DE S. POMBE

Par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium, nous avons défini la composition en sous unités de l'ATPase mitochondriale de *S. pombe*. Le facteur F_1 de cet organisme comporte cinq types de sous unités dont nous avons évalué les poids moléculaires.

Contrairement aux études faites chez la levure *S. cerevisiae* ces résultats montrent que la structure quaternaire du facteur F_1 de *S. pombe* est comparable à celles rapportées chez les mammifères (coeur de boeuf et foie de rat) (27). Nous avons mis en évidence sept sous unités supplémentaires dans le complexe ATPasique sensible à l'oligomycine. Mais deux de ces sous unités semblent être dues à une contamination du complexe purifié par d'autres protéines. Le complexe ATPasique mitochondrial de *S. pombe* comprendrait donc environ 10 types de sous unités dont nous avons défini les poids moléculaires.

HYPOTHESE D'ACTION DU DCCD ET DE LA CHALEUR SUR L'ATPase MITOCHONDRIALE :

ROLE DE L'INHIBITEUR PROTEIQUE DE L'ATPase MITOCHONDRIALE DANS LA STRUCTURE ET L'ACTIVITE DE CETTE ENZYME

Partant de l'observation originale (45 - 46) de l'effet de stimulation par le NN' dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) de l'activité ATPasique de S. pombe, nous avons étudié l'action de la chaleur, du chlorure d'étain tributylé (TBTC) et de la trypsine, in vitro, chez S. pombe, S. cerevisiae et le foie de rat. Ces effets paraissent semblables chez S. pombe et dans le foie de rat, mais sont différents chez S. cerevisiae.

L'action inhibitrice de l'activité ATPasique mitochondriale du DCCD est connue depuis plusieurs années, nous avons montré qu'à forte concentration, le DCCD stimule l'activité ATPasique de S. pombe et du foie de rat. Cette stimulation est plus intense lorsque le complexe ATPasique est extrait de la membrane mitochondriale interne.

- le TBTC paraît avoir une action comparable. Mais nous avons montré une nouvelle inhibition par des concentrations suboptimales.
- la chaleur stimule plus efficacement l'activité du complexe ATPasique solubilisé que celle des particules submitochondriales.

Nous n'avons pas observé de stimulation par le DCCD, le TBTC ou la chaleur dans le cas du facteur F_1 de S. pombe, mais selon la quantité de trypsine utilisée et comme le DCCD, la trypsine peut inhiber ou stimuler le complexe ATPasique solubilisé à partir de S. pombe.

Partant des connaissances suivantes :

- 1 - L'oligomycine inhibe l'activité ATPasique mitochondriale par action sur les facteurs intrinsèques du complexe ATPasique (35 - 81) ;
- 2 - L'antibiotique Dio 9 inhibe cette activité par action directe sur le facteur F_1 (70 - 71) ;
- 3 - Le DCCD (à faible concentration) inhibe cette activité par fixation irréversible sur les facteurs intrinsèques (13 - 78) ;
- 4 - L'inhibiteur protéique de l'ATPase mitochondriale est particulièrement sensible à l'action de la trypsine (31 - 59) ;

et de nos observations complémentaires suivantes :

- a) Le complexe ATPasique solubilisé à partir de S. pombe et traité par le DCCD à haute concentration ou par la chaleur, d'une part n'est plus sensible à l'oligomycine, mais reste sensible au Dio 9, et d'autre part ne présente plus les mêmes propriétés de migration sur un gradient de saccharose.
- b) Ce complexe ATPasique traité par la trypsine à haute concentration présente une sensibilité au froid comparable à celle du facteur F_1 isolé.

- c) Les particules submitochondriales de S. pombe exposées à la chaleur pendant un temps modéré présentent une activité ATPasique stimulée sans altération de la sensibilité à l'oligomycine.

Nous pouvons expliquer l'ensemble des modifications de l'activité ATPasique exposées précédemment par l'hypothèse suivante :

«Comme il a été montré pour la trypsine (51 - 39) et suggéré pour la chaleur (63), le DCCD à haute concentration (et le TBTC à concentrations «intermédiaires») agirait par inactivation ou dissociation d'un inhibiteur protéique de l'ATPase mitochondriale. Cette modification de l'inhibiteur protéique entraînerait une dissociation du complexe ATPasique isolé. Lorsque le complexe ATPasique est inclu dans la membrane interne mitochondriale, cette dissociation pourrait se limiter à un découplage fonctionnel sans libération réelle d'éléments protéiques».

Cette hypothèse implique que l'inhibiteur protéique de l'ATPase mitochondriale joue un rôle de lien, entre la partie purement catalytique de l'enzyme et l'ensemble des autres peptides à action «régulatrice» : OSCP et facteurs intrinsèques.

Ceci expliquerait les observations de Knowles et Penefsky (40) selon lesquelles le facteur F_1 renferme plus ou moins d'inhibiteur protéique selon la technique utilisée pour extraire ce F_1 .

Ces auteurs ont également suggéré que cet inhibiteur protéique existerait, in vivo, sous forme de dimère ou de polymère. Chaque monomère pourrait donc être considéré comme un maillon de la chaîne assurant la cohésion entre les deux parties du complexe ATPasique mitochondrial.

Cette hypothèse implique également l'absence (ou l'inactivité) de cet inhibiteur chez Saccharomyces cerevisiae et chez le mutant M 126 de S. pombe.

Chez S. pombe, cet inhibiteur pourrait être sensible à la répression glucose. D'autre part, la trypsine à faible concentration pourrait comme l'oligomycine ou le DCCD à faible concentration (1) inhiber l'ATPase mitochondriale en entraînant un changement de conformation de la partie régulatrice de l'enzyme, ce changement de conformation étant transmis à la partie purement catalytique de l'ATPase mitochondriale.

La corrélation que nous avons notée entre les effets du DCCD et le taux d'inhibition maximale par l'oligomycine (tableau 14) peut également être expliquée par la localisation de l'inhibiteur protéique du complexe ATPasique au sein de ce complexe, servant d'intermédiaire entre les facteurs nécessaires à la sensibilité à l'oligomycine et la partie catalytique de l'enzyme, cet inhibiteur pourrait dans une certaine mesure, limiter l'inhibition par l'oligomycine (et le DCCD à faible concentration).

Enfin l'effet sélectif du sulfate d'ammonium sur le complexe ATPasique qui entraîne une absence de stimulation par la chaleur mais une persistance de la stimulation par le DCCD, pourrait impliquer des points d'impact très précis et différents de ces agents sur l'inhibiteur protéique de l'ATPase mitochondriale.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ABRAMS A., BARON C.

Inhibitory action of Carbodiimides on bacterial membrane ATPase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1970 41 858 - 863.

2 - ABRAMS A., SMITH J. B., BARON C.

Carbodiimide resistant membrane adenosine triphosphatase in mutants of Streptococcus foecalis.
J. Biol. Chem 1972 247 1484 - 1488.

3 - ACCOCEBERRY B. STAHL A.

Séparation des membranes internes et externes de mitochondries de la levure Saccharomyces cerevisiae.
C. R. Acad. Sc-Paris. 1972 274 3135-3138.

4 - AZZI A., BRAGADIN M. A., NERI G., TAMBURRO A. M.

A spin-label carbodiimide as a probe for mitochondrial ATPase.
Febs Letters. 1973 30 249-252.

5 - BECK C., KASPAR von MEYENBURG H.

Enzyme pattern and aerobie growth of Saccharomyces cerevisiae under various degrees of glucose limitation.
J. Bacteriol. 1968 96 479-486.

6 - BEECHEY R. B., HOLLOWAY C. T., KNIGHT I. G., ROBERTON A. M.

Dicyclohexyl carbodiimide an inhibitor of oxidative phosphorylation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1966 23 75-80.

7 - BEECHEY R. B., ROBERTON A. M., HOLLOWAY C. T., KNIGHT I. G.

The properties of dicyclohexylcarbodiimide as an inhibitor of oxidative phosphorylation.
Biochemistry. 1967 6 3867-3879.

8 - BEYER R. E., CRANKSHAW D. L., KUNER J. M.

Induction of respiratory control in submitochondrial particles by dicyclohexylcarbodiimide.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967 28 758-763.

9 - BULDER C. J.

Induction of petite mutation and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various strains.
Antonie van Leeuwenhoek. 1964 30 1-7.

- 10 - BULOS B., RACKER E.
Further resolution of the rutamycin sensitive adenosin triphosphatase.
J. Biol. Chem. 1968 243 3891-3900.
- 11 - BYINGTON K. H.
Effets of triphenyltin compounds on the adenosine triphosphatase activity of beef heart submitochondrial particles.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1971 42 16-22.
- 12 - CAPALDI A., GREEN D. E.
Membrane proteins and membrane structure.
Febs letters. 1972 25 205-209.
- 13 - CATTEL K. J., KNIGHT I. G., LINDOP C. R., BEECHEY R. B.
The isolation of dicyclohexylcarbodiimide binding proteins from mitochondrial membranes.
Biochem. J. 1970 117 1011-1013.
- 14 - CATTEL K. J., LINDOP C. R., KNIGHT I. G., BEECHEY R. B.
The identification of the site of action of N, N' dicyclo hexylcarbodiimide as a proteolypid in mitochondrial membrane.
Biochem. J. 1971 125 169-177.
- 15 - CATTERALL W. A., PEDERSEN P. L.
Adenosine triphosphatase from rat liver mitochondria.
Purification, homogeneity and physical properties.
J. Biol. Chem. 1972 246 4987-4994.
- 16 - CATTERALL W. A., COTY W. A., PEDERSEN P. L.
Adenosine triphosphatase from rat liver mitochondria. Subunit composition.
J. Biol. Chem. 1973. in press.
- 17 - COLSON A. M., COLSON C., GOFFEAU A.
Systems for membrans alterations.
Genetique perturbation of mitochondria in a «petite negative» yeast.
Methods in Enzymology. in press.
- 18 - EPHRUSSI B., SLONIMSKY P. P., YOTSUYANAGI Y., TAVLITZKI J.
Variations physiologiques et cytologiques de la levure au cours du cycle de croissance aérobie.
C. R. Trav. Lab. Carlsberg. 1953 26 87-102.

- 19 - FIECHTER A., MIAN F. A., RIS H., HALVORSON H. O.
 Characterisation of insoluble protein fraction of mitochondria from Saccharomyces cerevisiae.
 J. Bacteriol. 1972 109 855- 861.

- 20 - FERNANDEZ-MORAN H., ODA T., BLAIR P. V., GREEN D. E.
 A macromolecular repeating unit of mitochondrial structure and function.
 J. Cell. Biol. 1964 22 63-100.

- 21 - FOURY F., GOFFEAU A.
 Glucose superrepressed and derepressed respiratory mutants in a «petite négative» yeast Schizosaccharomyces pombe 972 h⁻.
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972 48 153-160.

- 22 - FOURY F., GOFFEAU A.
 Combination of 2-deoxyglucose and snail-gut enzyme treatments for preparing sphaeroplast of Schizosaccharomyces pombe.
 J. Gen. Microbiol. 1973 75 227-229.

- 23 - GLEHN (von) M., NORRESTAM R., KIERKEGAARD P., MARON L., ERNSTER L.
 Three dimensional structure of oligomycin B.
 Febs Letters. 1972 20 267-269.

- 24 - GUILLORY R. J.
 The action of Dio 9 an inhibitor and an uncoupler of oxidative phosphorylation.
 Biochem. Biophys. Acta. 1964 89 197-207.

- 25 - GOFFEAU A., LANDRY Y., COLSON A. M., FOURY F.
 Dual control of synthesis of oligomycin sensitive ATPase in a «petite négative» yeast Schizosaccharomyces pombe.
 Febs meeting ; 1972 Amsterdam (610).

- 26 - GOFFEAU A., COLSON A. M., LANDRY Y., FOURY F.
 Modification of mitochondrial ATPase in chromosomal respiratory deficient mutants of a «petite négative» yeast Schizosaccharomyces pombe 972 h⁻.
 Biochem. Biophys. Res. Comm. 1972 48 1448-1454.

- 27 - GOFFEAU A., LANDRY Y., FOURY F., BRIQUET M., COLSON A. M.
 Deficient ATPase in a pleiotropic chromosomal yeast mutant.
 J. Biol. Chem. 1973 in press.

28 - HESLOT H., GOFFEAU A., LOUIS C.

Respiratory metabolism of a «petite négative» yeast Schizosaccharomyces pombe 972 h-.
J. Bacteriol. 1970 104 473-481.

29 - HESLOT, H., LOUIS, C., GOFFEAU A.

Segregational respiratory deficient mutants of a «petite-négative» yeast Schizosaccharomyces pombe 972 h-.
J. Bacteriol. 1970 104 482-491.

30 - HOLLOWAY C. I., ROBERTON A. M., KNIGHT I. G., BEECHEY R. B.

The binding of ¹⁴C dicyclohexylcarbodiimide to mitochondrial fractions.
Biochem. J. 1966 100 79 P.

31 - HORTSMAN, L. L., RACKER E.

Interaction between mitochondrial adenosine triphosphatase inhibitor and mitochondrial adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 1970 245 1336-1344.

32 - HUANG C. H., KEYHANI, E., LEE C. P.

Fractionation by sucrose density gradient centrifugation of membrane fragments derived from sonic disruption of beef heart mitochondria.
Biochim. Biophys. Acta 1973 305 455-473.

33 - JAYARAMAN J. C., COTMAN C., MAHLER H. R., SHARP C. W.

Biochemical correlates of respiratory deficiency-glucose repression.
Arch. Biochem. Biophys. 1966 116 224-251.

34 - KAGAWA Y., RACKER E.

Properties of a factor conferring oligomycin sensitivity on mitochondrial adenosine phosphatase.
J. Biol. Chem. 1966 241 2461-2466.

35 - KAGAWA Y., RACKER E.

Reconstruction of oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 1966 141 2467-2474

36 - KAGAWA Y., KANDRACH A. RACKER E.

Specificity of phospholipids required for energy transfer electron.
J. Biol. Chem. 1973 248 676-684.

37 - KAPLAN D., CRIDDLE R. S.

A comparison of insoluble mitochondria membrane proteins from glucose repressed and derepressed Saccharomyces carlsbergensis.
Biochim. Biophys. Acta 1970 203 249-255.

38 - KNIGHT I. G., HOLLOWAY C. I., ROBERTON A. M., BEECHEY R. B.

The chemical nature of the site of action of dicyclohexylcarbodiimide in mitochondria.
Biochem. J. 1968 109 27 p

39 - KNOWLES A. F., PENEFSKY H. S.

The subunit structure of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. Isolation procedures.
J. Biol. Chem. 1972 247 6617-6623.

40 - KNOWLES A. F., PENEFSKY H. S.

The subunit structure of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. Physical and chemical properties of isolated subunits.
J. Biol. Chem. 1972 247 6624-6630.

41 - LAMBETH D. O., LARDY H. A.

Purification and properties of rat liver mitochondrial adenosine triphosphatase.
Eur. J. Biochem. 1971 22 355-363.

42 - LANDRY Y.

Éléments subcellulaires : étude de quelques enzymes «marqueurs».
D. E. A. Biochimie appliquée. Université Nancy-I 1971.

43 - LANDRY Y., SIEST G.

Séparation des éléments subcellulaires de foie de rat par ultracentrifugation. Répartition de quelques enzymes «marqueurs».
Bull. Soc. Pharm. Nancy. 1971 89 32-40.

44 - LANDRY Y., GOFFEAU A.

Isolement et caractérisation du complexe ATPasique mitochondrial sensible à l'oligomycine chez la souche sauvage et des mutants respiratoires d'une levure «petite-négative» Schizosaccharomyces pombe.
Réunion Franco-belge de Biochimie. Strasbourg, mai 1972.
Arch. Inter. Phys. Bioch. 1972 80 604-606.

- 45 - LANDRY Y., PALANISWAMY P., GOFFEAU A.
Activation par des concentrations élevées de dicyclohexylcarbodiimide de l'activité ATPasique mitochondriale de levure.
Colloque «Membranes mitochondriales. Perméabilité et Biogenèse».
Société de Chimie Biologique. Grenoble, février 1973.
- 46 - LANDRY Y., GOFFEAU A.
Dual effect of dicyclohexylcarbodiimide on rat liver and yeast mitochondrial ATPase.
Société Belge de Biochimie. Mons, mai 1973.
Arch. Intern. Phys. Bioch. 1973 in press.
- 47 - LANDRY Y., GOFFEAU A.
Inhibition and stimulation of yeast and rat liver mitochondrial ATPase by heat and dicyclohexylcarbodiimide.
En cours de publication.
- 48 - LANDRY Y., GOFFEAU A.
Isolement, purification et propriétés du complexe ATPasique mitochondrial de la levure Schizosaccharomyces pombe.
En cours de publication.
- 49 - LANYI J. K.
Studies on the electron transport chain of extremely halophilic bacteria.
J. Biol. Chem. 1971 246 4552-4559.
- 50 - LARDY H. A. JOHNSON D., Mc MURRAY W. C.
Antibiotics as tools for metabolic studies : A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems.
Arch. Biochem. Biophys. 1958 78 587-597.
- 51 - LENA Z G.
Studies on the structure of the mitochondrial membranes.
Italian J. Biochem. 1970 19 54-82.
- 52 - LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 1951 193 265-275.

- 53 - Mac LENNAN D. H., TZAGOLOFF A.
Purification and characterisation of the oligomycin sensitive conferring protein.
Biochemistry 1968 7 1603-1610.
- 54 - MITCHELL P.
A chemiosmotic hypothesis for the mechanism of oxidative and photosynthetic phosphorylation.
Nature 1961 191 144-148.
- 55 - MITCHISON J. M.
Physiological and cytological methods for Schizosaccharomyces pombe.
Methods in cell physiology. 1970 IV, 131-164.
- 56 - NEAL W. K., HOFFMANN H. P., PRICE C. A.
Sedimentation behavior and ultra structure of mitochondria from repressed and derepressed yeast, Saccharomyces cerevisiae.
Plant. Cell. Physiol. 1971 12 181-192.
- 57 - PENEFSKY H. S.
Chemical modifications of mitochondrial adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 1967 242 5789-5795.
- 58 - PULLMAN M. E., PENEFSKY, H. S., DATTA A., RACKER E.
Purification and properties of a soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 1960 235 3322-3329.
- 59 - PULLMAN M. E., MONROY G. C.
A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine phosphatase.
J. Biol. Chem. 1963 238 3762-3769.
- 60 - PULLMAN M. E., PENEFSKY A. S.
Preparation and assay of phosphorylating submitochondrial systems : mechanically ruptured mitochondria.
Methods in Enzymology 1966 VI 277-284.
- 61 - RACKER E.
A mitochondrial factor conferring oligomycin-sensitivity on soluble mitochondrial ATPase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1963 10 435-439.

- 62 - RACKER E.
Resolution and reconstitution of the inner mitochondrial membrane.
Fed. Proceedings. 1967 26 1335-1340.
- 63 - RACKER E.
Mechanisms in Bioenergetics.
Academic Press, New York 1965.
- 64 - REYNOLDS J. A., TANFORD C.
Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios.
Possible implications for the state of proteins in biological membranes.
Proc. Natl. Acad. Sc. U. S. A. 1970 66 1002-1007.
- 65 - REYNOLDS J. A., TANFORD C.
The gross conformation of protein sodium dodecyl sulfate complexes.
J. Biol. Chem. 1970 245 5161-5165.
- 66 - REYNOLDS J. A.
Are inorganics cations essential for the stability of biological membranes ?
Ann. N. Y. Acad. Sc. 1972 195 75-85.
- 67 - RODBARD D., CHRAMBACH A.
Estimation of molecular radius, free mobility and valence using polyacrylamide gel electrophoresis.
Anal. Biochem. 1971 40 95-134.
- 68 - SENIOR A. E., BROOKS J. C.
Studies on the mitochondrial ATPase.
Arch. Biochem. Biophys. 1970 140 257-266.
- 69 - SENIOR A. E., BROOKS J. C.
The subunits composition of the mitochondrial oligomycin insensitive ATPase.
Febs Letters 1971 17 327-329.
- 70 - SCHATZ G., PENEFSKY H. S. RACKER E.
Interaction of purified mitochondrial adenosine triphosphatase bakers'yeast with submitochondrial particles from beef heart.
J. Biol. Chem. 1967 242 2552-2560.

- 71 - SCHATZ G.
Impaired binding of mitochondrial adenosine triphosphatase in the cytoplasmic «petite» mutant of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Biol. Chem. 1968 243 2192-2199.
- 72 - SCHNAITMAN C. A., ERWIN V., GREENAWALT J.
The submitochondrial localization of monoamine oxidase.
J. Cell. Biol. 1967 32 719-735.
- 73 - SCHNAITMAN C. A.
Comparison of rat liver mitochondrial and microsomal membrane proteins.
Proc. Natl. Acad. Sc. 1969 63 412-419.
- 74 - SCHNAITMAN C. A.
Solubilisation of the cytoplasmic membrane of *E. coli* by Triton X-100.
J. Bacteriol. 1971 108 545-552.
- 75 - SHAPIRO A. L., VINUELA E., MAIZEL J. V.
Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1967 28 815-820.
- 76 - SLATER E.
Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain.
Nature 1953 172 975-978.
- 77 - STADT R. J. van de, DE BOER B. L. VAN DAM K.
The interaction between the mitochondrial ATPase (F1) and the ATPase inhibitor.
Biochim. Biophys. Acta 1973 292 338-349.
- 78 - STEKHOVEN F. S., WAITKUS R. F., van MOERKERK H. T. B.
Identification of the dicyclohexylcarbodiimide binding protein in the oligomycin sensitive adenosine triphosphatase from bovine heart mitochondria.
Biochemistry 1972 11 1144-1150.
- 79 - SWANK R. T., MUNKRES K. D.
Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate.
Anal. Biochem. 1972 39 462-477.

- 80 - TZAGOLOFF A., Mac LENNAN D. H., BYINGTON K. H.
Isolation from the oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase complex of the factor which bind F1 and determine oligomycin sensitivity of bound F1.
Biochemistry 1968 7 1596-1602.
- 81 - TZAGOLOFF A., BYINGTON K. H., Mac LENNAN D. H.
The isolation and characterisation of an oligomycin sensitive adenosine phosphatase from bovine mitochondria.
J. Biol. Chem. 1968 243 2405-2412.
- 82 - TZAGOLOFF A.
Characterisation of some enzymes of the inner membrane of mitochondria.
J. Biol. Chem. 1969 244 5020-5026.
- 83 - TZAGOLOFF A.
Synthesis of the mitochondrial adenosine triphosphatase F1.
J. Biol. Chem. 1969 244 5027-5033.
- 84 - TZAGOLOFF A.
Function and synthesis of the oligomycin sensitivity conferring protein of yeast mitochondria.
J. Biol. Chem. 1970 245 1545-1551.
- 85 - TZAGOLOFF A.
Role of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis in the biosynthesis of the rutamycin sensitive adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 1971 246 3050-3056.
- 86 - TZAGOLOFF A.
A model of membrane biogenesis.
Bionergetics 1972 3 39-45.
- 87 - TZAGOLOFF A., MEAGHER P.
Properties of a dispersed preparation of the rutamycin sensitive adenosine triphosphatase of yeast mitochondria.
J. Biol. Chem. 1971 246 7328-7336.
- 88 - TZAGOLOFF A., MEAGHER P.
Mitochondrial synthesis of subunit proteins of the rutamycin sensitive adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem. 1972 247 595-603.

- 89 - TZAGOLOFF A., AKAI A., SIERRA, M. F.
Synthesis and integration of F1 subunits into the rutamycin-sensitive adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 1972 247 6511-6516.
- 90 - TZAGOLOFF A., AKAI A.
Properties of the products of mitochondrial protein synthesis in yeast.
J. Biol. Chem. 1972 247 6517-6523.
- 91 - ULLMANN A.
Repression catabolique 1970.
Biochimie 1971 53 3-8.
- 92 - UMBREIT W. W., BURRIS R. H., STAUFFER J. F.
Manometric techniques
Burgess Publishing Company. Minneapolis 1964.
- 93 - WATSON K., LINNANE A. W.
Headpiece stalk particles lining membranes of mitochondria isolated from normal and oligomycin resistant mutant of S. cerevisiae.
Bioenergetics 1972 3 235-243.
- 94 - WEBER K., OSBORN M.
The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 1969 244 4406-4412.
- 95 - WOLF K., SEBALD-ALTHAUS M., SCHWEYEN, R. J., KAUDEWITZ F.
Respiration deficient mutants of Schizosaccharomyces pombe.
Mol. Gen. Genet. 1971 110 101-109.
- 96 - YON, J.
Structure et dynamique conformationnelle des protéines.
Hermann, Paris 1969.

UNIVERSITE DE NANCY I

U. E. R. des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques

RELATIONS
ENTRE L'ACTIVITE ET LA STRUCTURE QUATERNAIRE
DE L'ATPase MITOCHONDRIALE

Thèse présentée par Yves LANDRY

Vu :
Nancy le 26 juillet 1973
Le Président de Thèse

Vu et Approuvé :
Nancy le 28 juillet 1973
Le Directeur de l'U.E.R. des
Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

M. PIERFITTE

R. BENE

Vu et Permis d'imprimer :
Nancy le 20 août 1973
Le Président de l'Université de Nancy I

J. R. HELLUY

